

# PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES DE *Penicillium* sp. OBTIDAS POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO

Anne Caroline Defranceschi Oliveira<sup>1</sup>, Maria Luiza Fernandes Rodrigues<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Acadêmica do curso de Tecnologia em Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tuiuti do Paraná (Curitiba, PR);

<sup>2</sup> Dra. em Química Orgânica, Prof<sup>a</sup>. Orientadora e Adjunto da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, Paraná, Brasil.

Endereço para correspondência: Maria Luiza F. Rodrigues, [mlmfernandes@hotmail.com](mailto:mlmfernandes@hotmail.com)

---

**RESUMO:** Proteases são enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas, sendo as enzimas mais empregadas industrialmente. A produção de enzimas por fermentação no estado sólido (FES) tem sido cada dia mais empregada, principalmente devido ao fato da reutilização de resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar na coagulação do leite proteases de *Penicillium* sp. obtidas por fermentação no estado sólido. A fermentação foi conduzida por 144 horas, sendo retiradas amostras a cada 24 horas para obtenção do pico de produção enzimática. O pico de produção de proteases foi observado em 96 horas, com atividade de 280 U/gSS. Nos ensaios de caracterização, a atividade enzimática foi dosada em diferentes pH e temperaturas, obtendo-se em ambos os testes dois picos de pH ótimo (7,0 e 8,5) e temperatura ótima (30 e 45°C). Estes resultados sugerem a presença de duas proteases ou isoformas, sendo necessários estudos de purificação e caracterização mais detalhados. A enzima foi eficaz na coagulação do leite, mostrando que esta pode ser uma nova enzima a ser aplicada na indústria de alimentos.

**Palavras-chave:** enzimas proteolíticas, coagulação do leite, fermentação no estado sólido.

---

**ABSTRACT:** Proteases are enzymes that hydrolyze peptide bonds, being the most industrially used enzymes. The enzyme production by solid state fermentation has been used more frequently due the reutilization of agroindustrial wastes. This work aim was to produce, characterize and apply over milk coagulation the proteases of *Penicillium* sp. obtained by solid state fermentation. The fermentation was conducted for 144 hours, samples were removed each 24 hours to obtain the maximum enzymatic production, which was observed in 96 hours, with an activity of 280U/gDS. Under the characterization essay, the enzymatic activity was measured under different pH values and temperatures, showing two peaks for both pH and temperature: pH 7 and 8,5 and temperature 30 and 45°C. These results suggest the presence of two proteases or isoforms, being necessary purification and more detailed characterization essays. The enzyme was efficient at the milk coagulation, showing that it can be a new enzyme applied in the food industry.

**Keywords:** proteolytic enzymes, milk coagulation , solid state fermentation.

---

## 1. INTRODUÇÃO

Proteases (proteínases ou peptidases) são enzimas capazes de clivar as ligações peptídicas de proteínas peptídeos ou aminoácidos. São classificadas na classe 3 das enzimas, as hidrolases, e sua subclasse é a (EC 3.4), das hidrolases que rompem as ligações peptídicas. Estas enzimas possuem grande aplicação industrial, e estão no grupo das 3 enzimas mais utilizadas em processos industriais, representando cerca de 60% das vendas internacionais desse setor (VERMELHO, 2010).

Estas enzimas apresentam uma ampla funcionalidade biológica, estando envolvidas em processos de suma importância fisiológica como a coagulação sanguínea, a digestão e também no processo de morte e diferenciação celular (RIFFEL, 2006). Industrialmente apresentam grande destaque no setor de alimentos, sendo utilizadas no processo de maturação de queijos, na fabricação de cervejas, e também para o aumento das características nutricionais de um alimento, uma vez que esta enzima quebra as proteínas em aminoácidos e peptídeos, facilitando a absorção pelo organismo (GACESA & HUBBLE, 1990). Mas não é apenas na indústria alimentícia que estas enzimas podem ser aplicadas. As proteases também são utilizadas na indústria de detergentes e ainda podem ter grande utilidade na fabricação de fármacos (cicatrizantes) e cosméticos (pellings) (VERMELHO, 2010).

A coagulação do leite é um dos processos de maior emprego das enzimas proteolíticas. Este processo geralmente é realizado por enzimas de origem animal, como a pepsina e a quimosina, porém a indústria necessita de enzimas que gerem graus de hidrólise da caseína diversificados, dependendo da característica que cada queijo requer, levando assim a necessidade de desenvolvimento de diferentes proteases, sendo as enzimas microbianas a principal fonte de estudos (SILVA, ALMEIDA & MARTINS, 2009).

Um dos fatores de maior importância é o modo que a enzima será obtida, ou seja, como proporcionar ao microrganismo a melhor condição para que este produza a enzima de interesse. A fermentação no estado sólido (FES) tem ganhado cada vez mais espaço, quando comparada à fermentação submersa, por possuir características diferenciadas, como a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, o que desperta forte interesse do ponto de vista da redução dos impactos gerados no ambiente e também do ponto de vista econômico; e, além disso, os metabólitos são produzidos de forma concentrada, facilitando a recuperação deste metabólico (PANDEY *et al.*, 1999). A utilização da FES para a produção de proteases pode ser uma boa opção, pois a indústria de cereais gera toneladas de resíduos com alto valor protéico, e podem ser uma ótima escolha para a produção de proteases, uma

vez que os microrganismos necessitam de indução para a produção do metabólico de interesse (GERMANO, 2000).

O objetivo deste trabalho foi produzir, caracterizar e aplicar na coagulação do leite, proteases obtidas por fermentação no estado sólido do fungo *Penicillium* sp.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Microbiologia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná.

### **2.1. MICRORGANISMOS**

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram fungos endofíticos isolados das folhas de mamona (*Ricinus communis* L.) que foram gentilmente cedidos pela Professora Roseli Mello, do laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná.

### **2.2 ESTERILIZAÇÃO DOS MEIOS E EQUIPAMENTOS**

Para garantir condições estéreis de crescimento dos microrganismos, os meios sólidos de propagação do inóculo e de produção, bem como todos os materiais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121 °C, durante 15 min.

### **2.3 ESTOQUE E MANUTENÇÃO DAS CEPAS**

As cepas foram inoculadas em meio BDA e incubadas por 7 dias a 28°C, fazendo-se repiques mensais, sendo após o crescimento mantidas sob refrigeração (4°C).

### **2.4 SELEÇÃO DE CEPAS COM ATIVIDADE PROTEOLÍTICA**

As cepas proteolíticas foram selecionadas em placa de Petri, conforme descrito por GERMANO (2000) com algumas modificações, em meio contendo leite em pó desnatado 2% como única fonte de carbono e ágar 1,5%. As cepas foram inoculadas por picada e incubadas a 28°C por 72 horas. A atividade proteolítica foi observada pela formação de halo transparente ao redor da colônia.

### **2.5 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FES**

Após crescimento do fungo em meio BDA por 7 dias, as células foram suspensas em tampão fosfato 100mM, pH 7,0 e submetidas à agitação, até a obtenção de uma solução

homogênea. A concentração de células foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Foram utilizados como substratos a cevada e o resíduo de cervejaria levedo de cerveja na proporção de 8:2, respectivamente, totalizando 10g de substrato sólido por fermentado. A umidade foi mantida por tampão fosfato 100mM pH 7,0.

A fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers de 125mL, com 10g de substrato sólido e umidade a 52%, onde foram inoculados assepticamente a solução de esporos na concentração de  $10^7$  esporos/gSS. Os Erlenmeyers foram incubados em Shaker a 28°C, sendo que amostras destes foram retiradas a cada 24 horas, por 144 horas, para determinação do pico máximo de produção da enzima (FERNANDES, 2006).

Para a recuperação da enzima do meio fermentado, foram adicionados 5mL de solução de NaCl 1% para cada grama de substrato sólido e mantido por 1 hora em agitação a 100rpm. Filtrou-se em tecido com pressão manual para obtenção do extrato bruto, que foi centrifugado a 2000rpm por 8min, desprezando-se o precipitado.

## 2.6 ENSAIO ENZIMÁTICO

A dosagem da atividade enzimática foi realizada pelo método descrito por SECADES & GUIJARRO (1999). Para o ensaio foram adicionados 120µL de amostra a 480µL de solução de azocaseína 1%, em pH 7,0. Incubou-se por 30min a 30°C. a reação foi paralisada por 600µL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Centrifugou-se a 2000rpm por 10min. Do sobrenadante foram retirados 800µL e adicionados 200µL de NaOH 1,8N. A absorbância foi lida a 420nm.

Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar 0,01 na absorbância à 420nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste, sendo o resultado expresso em U/mL, e posteriormente calculado para ser expresso em U/gSS (unidades por grama de substrato sólido).

## 2.7 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

### 2.7.1 pH ótimo de atividade enzimática

Para a avaliação da influência do pH na atividade enzimática, o ensaio enzimático foi conduzido conforme o item 2.6, sendo a azocaseína solubilizada em diferentes pHs: 5,5 – 6,0 (tampão acetato), 6,5 - 7,5 (tampão fosfato), 8,0 - 9,5 (tampão Tris-HCl) (THYS, 2004).

### 2.7.2 Temperatura ótima de atividade enzimática

Para a avaliação da influência da temperatura na atividade enzimática, o ensaio enzimático foi conduzido conforme o item 2.6, apenas variando a temperatura de incubação em: 10, 37, 45, 55 e 65°C (GIONGO, 2006).

## 2.8 LIOFILIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO

Para a liofilização, o extrato enzimático foi transferido para balões de fundo redondo, resfriado em congelador (-18°C) por 24 h e submetido à liofilização por mais 48 h. Depois de liofilizado, o sólido foi acondicionado em sacos plásticos, os quais foram armazenados em potes plásticos, à temperatura ambiente.

### 2.8.1 Teste de estabilizantes para a liofilização

Os extratos foram liofilizados com três diferentes estabilizantes a fim de avaliar a atividade residual. Os extratos foram divididos em quatro amostras: o extrato puro, extrato contendo leite em pó desnatado 1%, extrato contendo sorbitol 1% e extrato contendo sacarose 1%. Após a liofilização, todas as amostras foram suspensas em tampão fosfato 100mM e pH 7,0, ao final do mesmo volume inicial, para a mensuração da atividade residual conforme descrito no item 2.6.

## 2.9 DETERMINAÇÃO DA FORÇA COAGULANTE DA PROTEASE NO LEITE

A força coagulante foi dosada conforme descrito por BEHMER (1999). Um grama da enzima liofilizada foi diluída em 10mL de água destilada e adicionada em 1L de leite acrescido de 0,02g de CaCl<sub>2</sub>. O ensaio foi conduzido a 35°C, e o tempo para a formação da coalhada foi marcado. A força coagulante é calculada a partir deste resultado, apresentando a quantidade de coalho necessária para coagular 1000mL de leite em 40min.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 SELEÇÃO DAS CEPAS COM ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Foram testadas 30 cepas de fungos endofíticos isolados das folhas de mamona para avaliar sua capacidade de produção de enzimas proteolíticas. Destas 30 cepas, 16 (53,3%) apresentaram atividade proteolítica. A escolha da cepa para os ensaios de produção da enzima baseou-se na observação visual da formação do halo ao redor da colônia, característica observada por THYS (2004). A cepa escolhida foi a 7A, caracterizada por microcultivo como

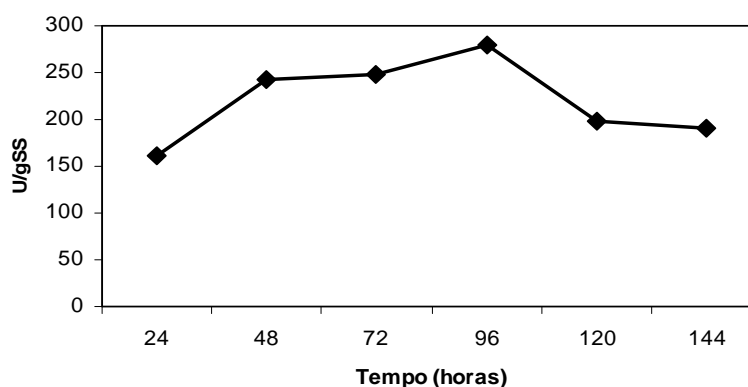
*Penicillium* sp. O microcultivo foi realizado pelo grupo de pesquisa da professora Roseli Mello, do laboratório de Microbiologia da Universidade Tuiuti do Paraná.



**Figura 01.** Halo de proteólise formado pela cepa de *Penicillium* sp. 7A em meio ágar leite.

### 3.2 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FES

A produção de proteases por fermentação no estado sólido foi conduzida utilizando como substratos cevada e levedo de cerveja em pH 7,0 durante 7 dias. A cada 24 horas uma amostra foi retirada para dosagem da atividade proteolítica, a fim de obter o pico de produção da enzima, que pode ser observado na Figura 2.

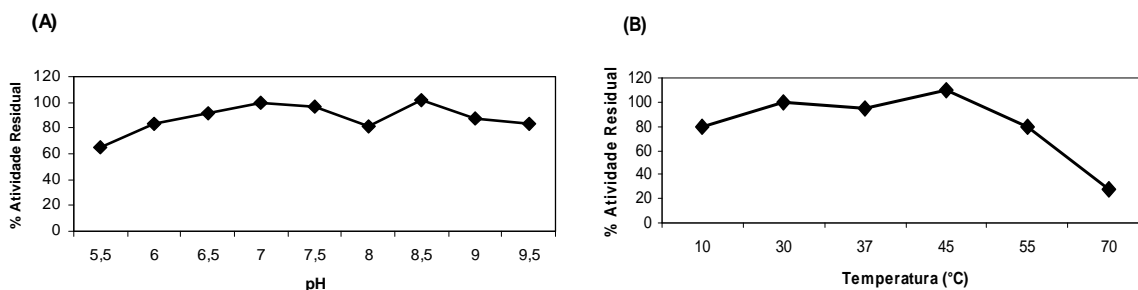


**Figura 02.** Atividade proteolítica dos extratos enzimáticos obtidos por fermentação no estado sólido do fungo *Penicillium* sp.

Como observado na Figura 2, o maior pico de produção ocorreu em 96 horas de fermentação a 28°C, com atividade de 280U/grama de substrato sólido (280U/gSS). A partir deste pico, a atividade começa a decrescer, sugerindo uma menor disponibilidade de nutrientes ou ainda a secreção de metabólitos tóxicos (SILVA, ALMEIDA & MARTINS, 2009).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA

Para a caracterização da enzima esta foi testada para obtenção de seu pH e temperatura ótimos de atuação. Como pode ser observado na Figura 3, tanto para a análise de pH quanto para a de temperatura a enzima apresentou dois picos de atividade.



**Figura 03.** (A) pH ótimo de atuação da protease, avaliado pelo método de hidrólise da azocaseína solubilizada em tampões de diferentes pH. (B) Temperatura ótima de atuação da protease, avaliado pelo método da hidrólise da azocaseína com incubações em diferentes temperaturas.

O pH ótimo foi observado primeiramente na faixa da neutralidade (entre 6,5 e 7,5) com melhor atividade em pH 7,0. Posteriormente foi observado que a enzima apresentou uma atividade equivalente em pH 8,5, formando dois picos de pH ótimo. Este resultado sugere a presença de mais de uma enzima no extrato bruto, ou até mesmo presença de isoformas.

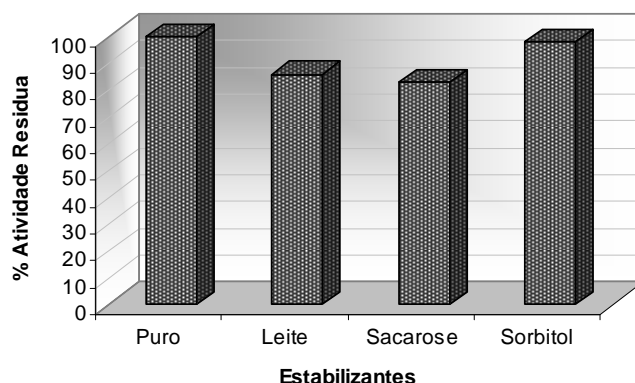
GERMANO (2000) produziu duas isoformas de serina proteases obtidas a partir do fungo *Penicillium* sp. por fermentação no estado sólido, ambas possuindo pH ótimo em 6,5.

Observando a Figura 3 (B), também observa-se dois picos de temperatura ótima, um a 30 e outro a 45°C. RATTRAY, BOCKELMANN & FOX (1995) obtiveram uma protease bacteriana com temperatura ótima em 50°C e pH ótimo em torno de 8,5, características semelhantes a um dos picos obtidos neste experimento.

CABRAL, CHERQUI & SIMÕES (2004) purificaram e caracterizaram duas distintas metaloproteases secretadas pela bactéria *Photorhabdus* sp. que apresentaram temperatura ótima em torno de 45°C as duas e pH ótimo uma em torno de 7,0 e a outra em torno de 9,0, semelhantes aos dois picos máximos para pH obtidos neste experimento.

### 3.3 LIOFILIZAÇÃO

No ensaio de liofilização foram utilizados três estabilizantes para verificar se estes auxiliavam na preservação da atividade enzimática depois do processo de liofilização. Em todas as amostras com os estabilizantes ocorreu um decréscimo da atividade, enquanto que a amostra liofilizada pura manteve 100% da atividade após a liofilização, como pode ser observado na figura 4.



**Figura 04.** Efeito da adição de estabilizantes a 1% no extrato enzimático para o processo de liofilização.

O sorbitol foi o melhor estabilizante para a protease, pois ocorreu uma perda de apenas 2 % na atividade enzimática. O extrato bruto puro manteve a atividade integral. Este resultado é bastante interessante para a aplicação da enzima a nível industrial, pois com a liofilização a enzima poderá ser armazenada por um longo período de tempo, além de estar em uma forma mais concentrada (FERNANDES, 2006).

### 3.4 APLICAÇÃO DA ENZIMA COMO COAGULANTE DO LEITE

Foi adicionado 1g da enzima liofilizada a 1L de leite e marcado o tempo necessário para a coagulação total. Em 45 minutos o leite foi coagulado, assim resultando em uma força coagulante de 890, o que significa que 1g de coalho coagula em 40 minutos 890ml de leite.

SILVA, ALMEIDA & MARTINS (2009) produziram proteases por fermentação no estado sólido do fungo *Gliocladium verticilloides* e aplicaram na coagulação do leite, obtendo também bons resultados.

Este resultado é bastante relevante, pois a obtenção de enzimas por fermentação no estado sólido é uma fonte barata e eficiente, pois a enzima é secretada de forma concentrada (PANDEY *et al.*, 1999), e com estes resultados é possível observar que está enzima se purificada e concentrada pode ser um potencial coagulante do leite.

## 4. CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos é possível concluir que a produção de proteases por fermentação no estado sólido utilizando resíduos de indústrias cervejeiras é uma opção válida. Em 96 horas de fermentação foram obtidas 280U/gSS ou 2800U totais, demonstrando a grande capacidade de secreção de proteases por está cepa de *Penicillium sp.*



Nos ensaios de caracterização da enzima, está se mostrou bastante estável frente as variações de pH e temperatura, e em ambos os ensaios foram obtidos dois picos ótimos para atividade, sugerindo a presença de mais de uma protease no extrato bruto enzimático.

O extrato enzimático liofilizado demonstrou atividade residual semelhante à observada no extrato antes de passar pelo processo. Quando o extrato bruto liofilizado foi empregado na coagulação do leite os resultados obtidos apontam que o extrato enzimático obtido pode ser um potencial coagulante do leite na indústria alimentícia.

Os resultados obtidos demonstraram a grande versatilidade e potencial deste extrato enzimático, porém são necessários mais estudos relacionados à purificação destas proteases para seu emprego industrial, e para a confirmação da presença de mais de uma enzima ou de sua isoforma.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEHMER, M.L.A. **Tecnologia do leite**. 13ed. São Paulo: Nobel, p. 147-151, 1999.

CABRAL, C.M.; CHERQUI, A.; PEREIRA, A. and SIMÕES, N. Purification and characterization of two distinct metalloproteases secreted by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus sp.* strain Az29. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.7, p. 3831 – 3838, 2004.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2006. 130f. Dissertação (Doutorado em Química) - Setor de Ciências Exatas - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2006.

GACESA, P. e HUBBLE, J. **Tecnología de las enzimas**. 1ed. Zaragoza: Acribia, p. 104-108, 1990.

GERMANO, S. **Desenvolvimento de bioprocessos para produção, caracterização e purificação de proteases de *Penicillium sp.* por fermentação no estado sólido**. 2000. 142f. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos) - Setor de Tecnologia - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2000.

GIONGO, J.L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 2006. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2006.

PANDEY, A., SELVAKUMAR, P., SOCCOL, C.R. and NIGAM, P. Solid state fermentation for the production of industrial enzymes. **Current Science**, v.77, n.1, p. 149 – 162, 1999.

RATTRAY, F.P., BOCKELMANN, W. and FOX, P.F. Purification and characterization of an extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.9, p. 3454 – 3456, 1995.

RIFFEL, A. **Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp. kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica.** 2006. 98f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz” – Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.

SECADES, P. and GUIJARRO, J.A. Purification and characterization of an extracellular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckery* and effect of culture conditions on production. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.9, p. 3969 – 3979, 1999.

SILVA, G.A.B.; ALMEIDA, W.E.S. e MARTINS, E.S. Produção e caracterização de proteases obtidas por *Glicocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, Ponta Grossa, v.03, n.1, p. 28 – 41, 2009.

THYS, R.C.S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr10.** 2004. 114f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Faculdade de Agronomia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2004.

VERMELHO, A.B. **Proteases de microrganismos.** Disponível em <http://www.protease.ufrj.br>. Acesso em: 13 mar. 2010.