

Influência da Temperatura na Atividade de Amilase e Protease de *Rhizopus oligosporus* cultivado por Fermentação em Estado Sólido

Bruna Escaramboni¹, Douglas Fernandes da Silva¹, e Pedro de Oliva Neto²

¹Universidade Estadual Paulista – Departamento de Microbiologia e Bioquímica
CEP 13506-900 Rio Claro – São Paulo - E-mail: douglasfsilva@gmail.com

²Universidade Estadual Paulista – Departamento de Ciências Biológicas
CEP 19.806-900 Assis – São Paulo

RESUMO

*Amilases e proteases constituem um dos principais grupos de enzimas industriais pelo seu amplo espectro de aplicações biotecnológicas. Elas podem ser obtidas a partir de fontes microbianas e com altos rendimentos por processos de fermentação em estado sólido (FES). Conhecer as características bioquímicas das enzimas é fundamental para adequação aos processos industriais. O objetivo do trabalho foi determinar a melhor temperatura para atividade das enzimas amilase e protease de *Rhizopus oligosporus* obtidas por fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo como substrato. Os melhores valores para atividade amilolítica e proteolítica foram obtidos nas temperaturas de 55 - 65 °C e de 50 - 60 °C, respectivamente. Estes resultados sugerem que as enzimas estudadas podem ser utilizadas em processos que empregam elevadas temperaturas.*

Palavras-chave: Amilase; Protease; *Rhizopus oligosporus*; Fermentação em Estado Sólido.

INTRODUÇÃO

As amilases compreendem uma importante classe enzimática com numerosas aplicações industriais e biotecnológicas, representando 25% do mercado de enzimas¹. No cenário atual há uma gama extensiva de aplicações tais como nas indústrias de alimentos, detergentes, papéis, têxteis, panificação, indústria química e farmacêutica e na fabricação de etanol^{2, 3, 4}. As proteases são enzimas que catalisam a clivagem das ligações peptídicas das proteínas. Elas têm ampla aplicação em detergentes, processamento de alimentos e na indústria do couro, bem como um crescente desenvolvimento do seu uso como uma classe de agentes terapêuticos⁵.

A principal vantagem do uso de micro-organismos para a produção de enzimas é o potencial econômico e capacidade de produção em larga escala, além da relativa facilidade de manipulação e obtenção de enzimas com características específicas^{6, 7}. A fermentação em estado sólido (FES) tem ganhado a atenção das pesquisas nos últimos 20 anos, e credibilidade entre muitas corporações industriais. Tem diversas vantagens sobre o processo convencional de fermentação submersa, muitas delas estão relacionadas à fisiologia especial apresentada pelos fungos em FES⁸.

A maioria das enzimas estudadas podem ser agrupadas sob o mesmo modelo estrutural, apesar de apresentarem características bioquímicas diferentes, como efeito da temperatura, pH,

inibidores e outros. Em geral, são diferenciadas em função da sua atividade, termo-estabilidade, e faixas ótimas de pH de atuação, fatores que determinam sua adequação aos processos industriais⁹.

O objetivo deste trabalho foi estudar a caracterização do extrato enzimático produzido em fermentação em estado sólido por *Rhizopus oligosporus* quanto a melhor temperatura para atividade amilolítica e proteolítica, visando maior conformação com os processos industriais.

MATERIAL E MÉTODOS

O fungo foi inoculado, na concentração de 10^6 esporos por grama de substrato, sobre o meio de FES, formulado com farelo de trigo como substrato e suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e ureia. As culturas foram incubadas à 30 °C por 120 horas. Após este período as enzimas foram extraídas pela adição de água destilada, seguida de agitação (180 rpm, 30 min, 30 °C) e filtração.

A atividade amilolítica foi determinada utilizando uma solução 0,5% (m/v) de amido em tampão acetato 0,05 M (pH 5,5) como substrato. A reação enzimática foi climatizada para 40, 50, 55, 60, 65 e 70 °C. Uma unidade amilolítica foi definida como a quantidade de enzima que libera o equivalente a 1 μmol de açúcar redutor por minuto de reação e quantificado pelo método DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico)¹⁰.

A atividade proteolítica foi determinada pela técnica de azocaseína. A mistura de reação foi preparada com 1% (m/v) de azocaseína em tampão acetato 0,05 M (pH 5,5) como substrato. A reação enzimática foi climatizada para 30, 40, 50, 55, 60, 65 e 70 °C. Uma unidade proteolítica foi definida como o aumento de 0,01 na absorbância à 440 nm por minuto da reação teste, comparado com o controle da reação¹¹.

Para análise do efeito da temperatura sobre a atividade amilolítica e proteolítica do extrato enzimático as reações foram realizadas em triplicata e os dados expressos em atividade relativa (%).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a atividade da amilase de *R. oligosporus* em uma faixa de 40 a 70 °C. Foram verificados valores de atividade relativa superior a 85% nas reações climatizadas entre 55 e 65 °C. Houve uma redução para 64% a 70 °C, demonstrando que temperaturas mais elevadas ocasionam a desnaturação da enzima.

A protease de *R. oligosporus* apresentou atividade máxima à 55 °C, de modo que observa-se valores superiores à 85% nos ensaios realizados entre 50 e 60 °C (Figura 2). Estes dados demonstram um caráter termoestável da enzima estudada superior ao obtido pela protease purificada de *Bacillus subtilis* NRC 3, que apresentou temperatura ótima de 40 °C, utilizando azocaseína como substrato¹².

Figura 1. Efeito da temperatura sobre a atividade da amilase de *Rhizopus oligosporus* produzida por fermentação em estado sólido.

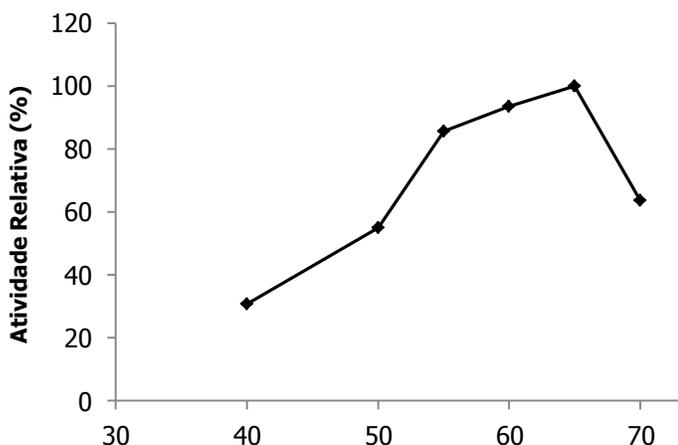
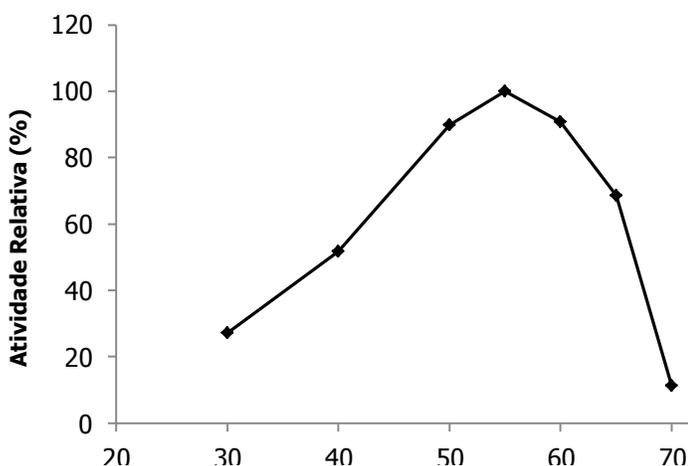


Figura 2. Efeito da temperatura sobre a atividade da protease de *Rhizopus oligosporus* produzida por fermentação em estado sólido.



Diversos processos industriais empregam elevadas temperaturas, fazendo com que haja uma importante demanda por enzimas termoestáveis, como as produzidas por microrganismos termofílicos. No entanto, mesmo entre os mesófilos, como os fungos, que crescem entre 28 °C e 32 °C, é possível encontrar enzimas que atuam em temperaturas até 30 °C acima da temperatura máxima de crescimento¹³.

Os dados revelam que ambas as enzimas produzidas pelo fungo apresentam uma faixa semelhante de temperatura para a obtenção dos maiores valores de atividade enzimática, o que permite que sejam aplicadas em conjunto nos processos que utilizam várias enzimas de forma concomitante.

CONCLUSÕES

As enzimas estudadas, produzidas por *Rhizopus oligosporus* em fermentação em estado sólido, apresentaram uma faixa de 10 °C com atividade relativa acima de 85%, sendo de 55 a

65 °C para amilase e de 50 a 60 °C para protease. Esta característica indica versatilidade dos catalisadores, garantindo que sejam utilizados em múltiplos processos biotecnológicos que ocorrem em temperaturas elevadas.

REFERÊNCIAS

- (1) KUMAR, V.; SAHAI, V.; BISARIA, V.S. Production of amylase and chlamydospores by *Piriformospora indica*, a root endophytic fungus. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 124-128, 2012.
- (2) VAN DER MAAREL, M. J. E. C.; VAN DER VEEN, B.; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. **Journal Biotechnology**, v. 94, p. 137–155, 2002.
- (3) MITIDIERI, S.; MARTINELLI, A. H. S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulations. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1217–1224, 2006.
- (4) CASTRO, A. M.; CARVALHO, D. F.; FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Economic analysis of the production of amylases and other hydrolases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, p. 1-9, 2010.
- (5) LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155–1163, 2013.
- (6) GUPTA, R.; GIGRAS, P.; MOHAPATRA, H.; GOSWAMI, V. K.; CHAUHAN, B. Microbial α -amylases: a biotechnological perspective. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1599-1616, 2003.
- (7) SOUZA, P. M.; MAGALHÃES, P. O. Application of microbial α -amilase in industry – A review. **Brasilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 850 – 861, 2010.
- (8) BARRIOS-GONZÁLEZ, J. Solid-state fermentation: Physiology of solid medium, its molecular basis and applications. **Process Biochemistry**. v. 47, p. 175-185, 2012.
- (9) KEARSLEY, M. W.; DZIEDIC, S. Z. **Handbook of starch hydrolysis products and their derivatives**. London: Chapman & Hall; 1995.
- (10) MILLER, G. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**. v.31, p. 426-428, 1959.
- (11) LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A.. "The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*". **J. Mol. Biol.**, v.76, p.103–122, 1973.
- (12) TORK, S. E.; SHAHEIN, Y. E.; EL-HAKIM, A. E.; ABDEL-ATY, A. M.; ALYA, M. M. Production and characterization of thermostable metallo-keratinase from newly isolated *Bacillus subtilis* NRC 3 **International Journal of Biological Macromolecules** v. 55, p. 169– 175, 2013.
- (13) GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química nova**, v. 30, n. 1, p. 136-145, 2007.