

## Application of carboxypeptidase from *Rhizopus* on ochratoxin A degradation

### Aplicação de carboxipeptidase obtida de *Rhizopus* na degradação de ocratoxina A

Títulos abreviados:

*Ochratoxin degradation by carboxipeptidase A*

*Degradação de ocratoxina por carboxipeptidase A*

Larine Kupski<sup>1\*</sup>, Chiara Leal Alves<sup>1</sup>, Jaqueline Garda-Bufferon<sup>1</sup>, Eliana Badiale-Furlong<sup>1</sup>

#### ABSTRACT

Mycotoxins are secondary metabolites produced by filamentous fungi in different food chain stages. Among mycotoxins, ochratoxin A (OTA) is of great importance, and presents carcinogenic, teratogenic and nephrotoxic effects. These effects have motivated the development of methods to reduce the contamination levels to the allowed levels. Biological methods involving the use of enzymes and microorganisms for OTA degradation has excelled due the specific reaction and mild conditions for detoxification. In this work we established conditions for the extraction of carboxypeptidase A from fermented biomass by *Rhizopus oryzae* in order to employ it in the OTA degradation, using pancreatin as control. The standardized methodology for enzymatic extraction consisted of ultrasonic agitation for 30 minutes in a fixed power of 150 W and 40 kHz. The enzyme extract of the microorganism showed a degradation capacity of 19.4%, which caused degradation higher (49%) than the one found during pancreatin action. This result confirms the advantage of using microbial enzymes over those from vegetables including micotoxycology biodegradation processes.

**Keywords:** mycotoxin degradation, micro-organism, enzymatic hydrolysis.

<sup>1</sup> Universidade Federal do Rio Grande – Escola de Química e Alimentos. Caixa Postal 474 – CEP 96203900 Rio Grande – RS

\*Autor para correspondência [larinekupski@yahoo.com.br](mailto:larinekupski@yahoo.com.br)

#### RESUMO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos em diferentes etapas da cadeia produtiva de alimentos. Entre micotoxinas, ocratoxina A (OTA) é de grande importância, e apresenta efeitos carcinogênicos, nefrotóxicos e teratogênicos. Estes efeitos vêm motivando o desenvolvimento de métodos capazes de diminuir esta contaminação aos níveis permitidos pela legislação. Os métodos biológicos envolvendo o uso de enzimas e microorganismos para degradação da OTA tem se destacado, em função da especificidade reacional e das condições brandas para a detoxificação. Neste trabalho foram estabelecidas condições de extração de carboxipeptidase A a partir de biomassa fermentada por *Rhizopus oryzae* para empregá-la na degradação de OTA, tendo pancreatina como controle. A metodologia padronizada para extração enzimática consistiu em agitação ultrassônica durante 30 minutos numa potencia fixa de 150 W e 40kHz. O extrato enzimático do microorganismo apresentou uma capacidade de degradação de 19,4%, que ocasionou uma degradação 49% superior a ação da pancreatina. Este resultado confirma a vantagem da utilização de enzimas microbianas em detrimento as de origem vegetal inclusive para processos de biodegradação micotoxicologica.

**Palavras-chave:** degradação micotoxicológica; micro-organismo, hidrólise enzimática.

## INTRODUÇÃO

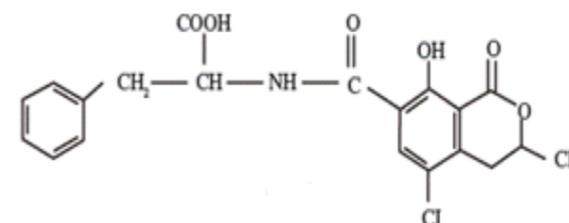
As micotoxinas são substâncias naturais de baixo peso molecular, produzidas por fungos filamentosos como metabólitos secundários em qualquer etapa da cadeia produtiva (KÖPPEN *et al.*, 2010). A ocratoxina A (OTA), considerada cancerígena do grupo 2B pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 1993) pode ser produzida por fungos do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo encontrada em cereais e em produtos como café, vinho, frutos secos, cerveja e sumo de uva (ZAIN, 2011).

Embora a prevenção do crescimento e produção micotoxicológica de fungos em plantas e alimentos é normalmente considerada como a melhor abordagem para impedir os efeitos nocivos das micotoxinas na saúde animal e humana, a descontaminação de produtos agrícolas contaminados é também de primordial importância. Diferentes estratégias para este fim já vem sendo estudadas, sendo classificados como métodos físicos, químicos e (micro) biológicos (Varga *et al.*, 2005).

Dentre estes, os biológicos tem destaque em pesquisas por serem necessárias condições brandas de reação e pela diminuição da possibilidade de produção de derivados mais tóxicos. Para isso, são utilizadas leveduras, bactérias e fungos não toxigênicos capazes de inibir o crescimento de fungos toxigênicos e diminuir os níveis toxina a níveis aceitáveis pela legislação, 2-30 µg kg<sup>-1</sup> (EC, 2011). A principal via de degradação de OTA por micro-organismos envolve a hidrólise da ligação amida, que liga a porção isocumarina não tóxica da OTA com a molécula de fenilalanina, mediante ação de enzimas proteolíticas intra ou extracelulares, conforme ilustrado na Figura 1.

Neste contexto encontram-se as carboxipeptidases, que podem ser obtidas de leveduras, como *Phaffia rhodozyma* e fungos filamentosos (STANDER *et al.*, 2001; ABRUNHOSA *et al.*, 2002; VARGA *et al.*, 2005;

AMÉZQUETA *et al.*, 2009). Uma espécie de *Rhizopus oryzae*, isolada da casca de arroz, depositada no Banco de Culturas da Fundação André Tosello (CCT 7560) e posteriormente identificada por técnicas moleculares. Empregando este micro-organismo, Kupski *et al.* (2014) avaliaram a produção de celulases durante processo fermentativo em farelo e casca de arroz e Oliveira *et al.* (2010) avaliaram a disponibilização de nutrientes como proteínas e compostos fenólicos. No entanto a utilização de enzimas, como a carboxipeptidase A, extraídas deste micro-organismo para aplicação em descontaminação de micotoxinas não foi relatado na literatura, apesar dos relatos da ação na degradação de micotoxinas durante a fermentação com *R. oryzae* (VARGA *et al.*, 2005).



**Figura 1** Estrutura da ocratoxina A

Neste trabalho foram estabelecidas condições de extração de carboxipeptidase a partir de biomassa fermentada pela linhagem selvagem *R. oryzae* CCT 7560 para aplicação na degradação de OTA comparando o efeito hidrolítico ao da pancreatina

## MATERIAL E MÉTODOS

### Fonte enzimática

A enzima pancreatina foi obtida da Sigma Aldrich®, a partir da qual foi preparada a solução enzimática (2mg.mL<sup>-1</sup>) usando água destilada para aplicação nos experimentos.

A biomassa de *R. oryzae* foi cultivada em substrato farelo e casca de arroz (17,5 e 82,5%) em biorreatores do tipo bandeja durante 15 h a 30°C, tendo como concentração inicial de esporos  $4 \times 10^6$  esporos.g<sup>-1</sup> e umidade de 30% (KUPSKI et al., 2014).

#### Estudo das condições de extração da enzima carboxipeptidase

Para este estudo foi utilizada a metodologia OFAT (*one factor at a time*), avaliando diferentes fatores individualmente. O primeiro estudado foi o sistema de agitação: (i) banho ultrassônico de 40 kHz e (ii) agitação orbital a 150 rpm, ambos durante 30 minutos; seguido da frequência de ondas ultrassônicas (25, 37 e 40 kHz) com potencia fixa de 150 W e na melhor frequência os tempos de extração (15, 30, 45 e 60 min).

A extração foi realizada com água destilada na proporção 1:5 (p/v) em cada condição descrita anteriormente, seguida por centrifugação a 4°C e 3220 xg durante 10 minutos, obtendo-se assim o extrato bruto enzimático (P<sub>0</sub>).

Para purificação primária foi utilizada acetona na proporção 1:3 (v/v) a 0°C durante 2 horas. Após a remoção do excesso de solvente, a proteína foi ressuspensa em água para quantificação de acordo com Lowry *et al.* (1951) e determinação de atividade enzimática.

#### Determinação de atividade e proteína solúvel

A atividade de carboxipeptidase A foi determinada utilizando como substrato hipuril-L-Phe (H-PHE) 0,1 mM, preparado em tris-HCl 25 mM (pH 7,5), contendo NaCl 500 mM. O aumento na absorvância, medida a 254 nm, foi acompanhado por 15 min, tomando-se a tangente da região linear. A atividade foi calculada utilizando-se um coeficiente de extinção molar de 360 l (mol cm)<sup>-1</sup> (PEDROCHE *et al.*, 2002). Uma unidade foi definida como a quantidade de proteína necessária para hidrolisar 1 μmol de H-PHE por minuto a 25°C e pH 7,5.

Para determinação da atividade específica, a atividade foi correlacionada com o teor de proteína solúvel dos extratos, conforme a equação 1.

$$\text{Atividade específica} = \frac{\text{Atividade (U)}}{\text{Proteína solúvel (mg)}} \quad (1)$$

#### Degradação de ocratoxina A

Para o ensaio de degradação, OTA foi dissolvida em tampão tris HCl pH 7,5 25 mM contendo NaCl 0,5 M e quantificada a 380 nm (absortividade 7160 M cm<sup>-1</sup>) (PITOUT, 1969).

A hidrólise de OTA foi acompanhada a 380 nm aos 30 e 60 min a 25 °C, tendo como meio reacional 1 mL da solução da micotoxina (25 μg mL<sup>-1</sup>) 0,5 mL de tampão tris HCl pH 7,5 e 0,5 mL de pancreatina ou extrato parcialmente purificado (P<sub>1</sub>) de *R. oryzae*. A avaliação da degradação foi expressa em termos de hidrólise e hidrólise específica, determinadas de acordo com as equações 2 e 3.

$$\text{Hidrólise} = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Hidrólise específica} = \frac{\% \text{ Hidrólise}}{\text{Proteína solúvel (mg)}} \quad (3)$$

Onde:

C<sub>1</sub>- concentração inicial de OTA;

C<sub>2</sub>- concentração de OTA após hidrólise;

#### Análise estatística

A análise estatística dos resultados de atividade específica, hidrólise e hidrólise específica, foi realizada por ANOVA considerando as médias de triplicatas dos ensaios, seguida pelo teste de Tukey a um nível de 5 %

( $p < 0,05$ ), utilizando o programa “Statistica” (versão 7.0, StatSoft, Inc., Tulsa, USA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Padronização da extração

O estudo do sistema de extração (orbital ou ultrassônico) foi avaliado na biomassa fermentada com *R. oryzae* (Tabela 1). A agitação ultrassônica em ambos os extratos (bruto ( $P_0$ ) e purificado ( $P_1$ )) melhorou o rendimento da extração (1,5 vezes) em relação à agitação orbital. Este comportamento pode ser atribuído a maior eficiência das ondas ultrassônicas para romper a

extração (1,5 vezes) em relação à agitação orbital. Este comportamento pode ser atribuído a maior eficiência das ondas ultrassônicas para romper a parede celular e liberar enzimas intracelulares da biomassa fúngica (MASON, 2003). O emprego de ultrassom como uma ferramenta para extração de metabólitos de origem vegetal e compostos bioativos de material vegetal ou animal (CHEMAT; HUMA; KHAN, 2011) tem sido crescente, uma vez que propicia maior eficiência de recuperação sem a necessidade de aumento do volume de extrator, o que gera menos danos ambientais e ao analista (KAPTUROWKA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

A etapa de purificação primária com acetona aumentou em 7 vezes a atividade enzimática hidrolítica da enzima, comportamento esperado, visto

**Tabela 1** Condições testadas para a padronização da extração de carboxipeptidaseA

Sistema**	Atividade (mUmgsproteína <sup>-1</sup> )	Frequência (kHz)**	Atividade (mU mgproteína <sup>-1</sup> )	Tempo (min)	Atividade (mU mgproteína <sup>-1</sup> )
Orbital $P_0$	S.A.	25,0	S.A.	15	35,9 (3,5) <sup>c</sup>
Orbital $P_1$	23,0 (1,8) <sup>b</sup>	37,0	22,3 (4,5) <sup>b</sup>	30	39,1 (0,1) <sup>a</sup>
Ultrassom $P_0$	5,0 (2,0) <sup>c</sup>	40,0	39,5 (0,8) <sup>a</sup>	45	36,5 (0,6) <sup>b</sup>
Ultrassom $P_1$	35,5 (16,6) <sup>a</sup>			60	21,0 (4,8) <sup>d</sup>

\* Resultados expressos como Média (CV). S.A.- sem atividade.  $P_0$ - Extrato bruto;  $P_1$ - Extrato parcialmente purificado. \*\*Estudo realizado em 30 min.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

que a mudança da constante dielétrica do meio ocasionada pela adição de acetona propicia a diminuição de interferentes do meio.

A frequência de 40 kHz foi mais eficiente (Tabela 1), representando um aumento de 77% na atividade da carboxipeptidase A em relação à frequência de 37 kHz. Em baixas frequências, as forças de cisalhamento geradas são muito fortes devido ao colapso mais entrópico da bolha, causando consequentemente a desnaturação protéica e decréscimo de atividade (CHANDRAPALA *et al.*, 2012), como pode ser verificado neste estudo.

Com base nos resultados encontrados ficou adotado como procedimento de extração a utilização de banho ultrassônico 40 kHz durante 30 min e a purificação do extrato com acetona ( $P_1$ ) na proporção 1:3 (v:v).

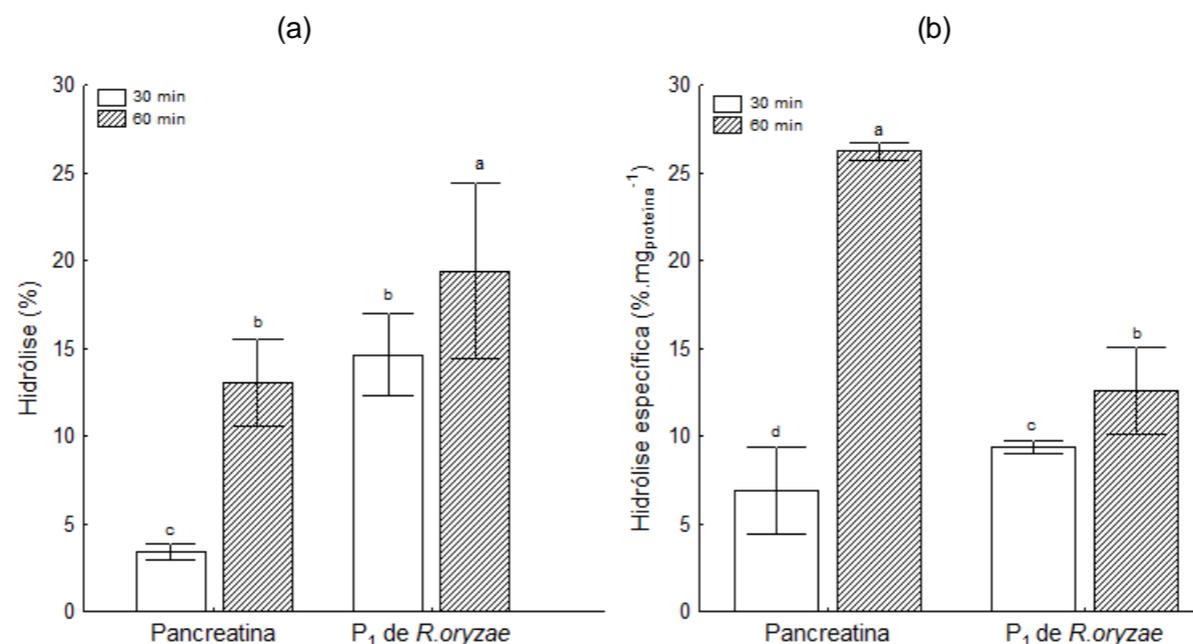
### Degradação enzimática de OTA

A alta incidência de OTA e seus efeitos nocivos em seres humanos e animais tem motivado a busca por métodos de degradação eficientes e não geradores de derivados tóxicos (AMÉZQUETA *et al.*, 2009). O principal caminho pelo qual os micro-organismos podem descontaminar OTA

envolve a hidrólise da ligação amida que une a OT $\alpha$  (derivado não tóxico de OTA) à molécula de fenilalanina (ABRUNHOSA *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a diminuição do teor de ocratoxina A mediante ação das diferentes enzimas, extrato P<sub>1</sub> de *R. oryzae* e pancreatina (240 mU mg proteína<sup>-1</sup>) está descrita na Figura 2.

**Figura 2** Taxa de hidrólise (a) e hidrólise específica (b) de OTA mediante ação enzimática em meio reacional. Letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). (P1) extrato purificado de *R. oryzae*



A hidrólise da OTA (Figura 1a) aumentou significativamente com o tempo de reação tanto para pancreatina quanto para a enzima extraída de *R. oryzae*. A hidrólise de OTA promovida pela enzima fúngica foi 4 e 1,5 vezes superior a enzima de origem animal (pancreatina) em 30 e 60 minutos, respectivamente.

A hidrólise específica (Figura 1b) aumentou significativamente com o tempo reação. No entanto, se comparando a ação das enzimas de diferentes fontes (fúngica e animal), aos 30 minutos de reação a hidrólise específica da enzima proveniente da biomassa de *R. oryzae* é 37% maior

que a da pancreatina, indicando uma maior especificidade da enzima fúngica a OTA. A máxima hidrólise específica promovida pela pancreatina ocorreu aos 60 min de reação (26,2% (mg proteína)<sup>-1</sup>), atribuído ao fato de que a pancreatina é uma enzima comercial purificada onde estão presentes várias enzimas proteolíticas além da carboxipeptidase A. Portanto, a enzima fúngica se mostra como alternativa a pancreatina para processos de degradação, especialmente quando se requer intervalos menores para degradação de OTA. Vale ressaltar que a biomassa produzida por *R. oryzae* havia sido otimizada para produção de celulase, e ainda assim ficou

demonstrado o potencial do micro-organismo para produção de carboxipeptidases ativas contra a OTA. Este fato é bastante promissor, visto que o fungo produtor é de uma linhagem selvagem, no qual pode-se realizar modificações genéticas visando a maximização da produção da protease para emprego nos processos de descontaminação.

Os resultados encontrados corroboram com o obtido em estudo (VARGA *et al.*, 2005) que avaliou a degradação de ocratoxina por diferentes espécies de *Rhizopus*, encontrando uma redução de até 96,5 % no conteúdo inicial de OTA no substrato com *R. stolonifer*. Relatos da ação da pancreatina na redução desta micotoxina não foram encontrados na literatura.

É importante salientar que na maioria dos estudos de degradação, não é usual a extração da enzima para aplicá-la em degradação, sem uso do micro-organismo. Trata-se, portanto de um aspecto inovador para processos de degradação, que pode se adaptar melhor a condições de purificação e disponibilização para fins comerciais.

## CONCLUSÃO

A utilização de banho ultrassônico de 40 kHz durante 30 min foi a melhor condição para extração de carboxipeptidase do *R. oryzae*. O extrato enzimático contendo carboxipeptidase foi capaz de reduzir os níveis iniciais de OTA em até 20%, podendo este ser empregado em processos para minimizar a contaminação no produto final. Além disso, o trabalho salienta a vantagem da utilização de enzimas microbianas em detrimento as de origem vegetal inclusive para processos de biodegradação micotoxicológica

## REFERÊNCIAS

ABRUNHOSA, L.; SERRA, R.; VENÂNCIO, A. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n.25, p. 7493-7496, 2002.

AMÉZQUETA, S.; GONZÁLES-PEÑAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, n. 4, p. 326-333, 2009.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência Brasil, 2008.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 5, p. 975-983, 2012.

CHEMAT, F.; HUMA, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

**European Commission**. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document SANCO/12495/2011, National Food Administration, Sweden, 2011.

**International Agency for Research on Cancer**. (IARC). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins, vol. 56, IARC, Geneva (1993), pp. 489-599

KAPTUROWSKA, A. U.; STOLARZWICZ, I. A.; KRZYCZKOWSKA, J.; BIALECKA-FLORJANCZYK, E. Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 186-191, 2012.

KÖPPEN, R.; KOCH, M.; SIEGEL, D.; MERKEL, S.; MAUL, R.; NEHLS, I. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, n.6, p. 1595-1612, 2010.

KUPSKI, L.; PAGNUSSATT, F. A.; GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Endoglucanase and Total Cellulase from Newly Isolated *Rhizopus oryzae* and *Trichoderma reesei*: Production, Characterization, and Thermal Stability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.172, n.1, p.458-468, 2014.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, M. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, n.1, p. 265-275, 1951.

MASON, T. J. Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.10, n. 4-5, p. 175- 179, 2003.

OLIVEIRA, M. S.; KUPSKI, L.; FEDDERN, V.; CIPOLATTI, E. P.; BADIALE-FURLONG, E.; SOUZA-SOARES, L. A. Physico-chemical characterization of fermented rice bran biomass. **CyTA- Journal of Food**, v. 8, n. 3, p. 229-236, 2010.

PEDROCHE, J.; YUST, M. M.; GIRÓN-GALLE, J.; VIOQUE, J.; ALAIZ, M.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M.; MILLÁN, F. Stabilization-immobilization of carboxypeptidase A to aldehyde-agarose gels. A practical example in the hydrolysis of casein. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 711-718, 2002.

PITOUT, M. J. A rapid spectrophotometric method for the assay of carboxipeptidase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, n.8, p. 1829-1836, 1969.

SILVA, J. R. F.; CANTELLI, K. C.; TRES, M. V.; ROSA, C. D.; MEIRELLES, M. A. A.; SOARES, M. B. A.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V.; TREICHEL, H.; MAZUTTI, M. A. Treatment with compressed liquefied petroleum gas and ultrasound to improve cellulase activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 102-107, 2013.

STANDER, M. A.; STEYN, P. S.; VAN DER WESTHUIZEN, F. H.; PAYNE, B. E. A kinetic study into the hydrolysis of the ochratoxins and analogues by carboxypeptidase A. **Chemical Research in Toxicology**, v.14, n.3, p. 302-304, 2001.

VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVÖLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, n. 3, p. 321-328, 2005.

ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 129-144, 2011.

RECEIVED 12 Nov 2013  
ACCEPTED 20 MAR 2014