

# PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamarii* URM4634 POR CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

*Application of quality tools in the control of losses in the filling stage of the productive process of a small beverage industry*

## Resumo:

Proteases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas onde há a quebra das ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Sua obtenção através dos microrganismos apresenta algumas vantagens, como a facilidade de produção em larga escala, condições controladas de temperatura e pH. O presente trabalho objetivou purificar as proteases produzidas por *Aspergillus tamarii* URM4634 utilizando cromatográfico de troca iônica. O micro-organismo *Aspergillus tamarii* URM4634 se mostrou um potencial produtor de proteases, apresentando uma atividade proteásica de 60,3 U/mL após 72 horas de fermentação. Os processos de downstream que envolvem etapas de purificação, obtiveram resultados satisfatórios através de precipitação por acetona, e pela cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A50, apresentando um aumento no seu fator de purificação em 4,4 vezes com uma recuperação de 24,3%. Assim, a purificação por cromatografia de troca iônica mostrou-se vantajosa para utilização destas enzimas em aplicações na indústria de alimentos.

## Abstract:

Proteases are enzymes that catalyze hydrolytic reactions where there is a breakdown of peptide bonds between the amino acids of proteins. Its obtaining through the microorganisms presents some advantages, such as the ease of production in large scale, controlled conditions of temperature and pH. The present work aimed to purify the proteases produced by *Aspergillus tamarii* URM4634 using ion exchange chromatography. The microorganism *Aspergillus tamarii* URM4634 proved to be a potential protease producer, presenting a protease activity of 60.3 U / mL after 72 hours of fermentation. The downstream processes involving purification steps have obtained satisfactory results through acetone precipitation and DEAE Sephadex A50 ion exchange chromatography, showing an increase in its purification factor by 4.4 times with a recovery of 24.3%. Thus, purification by ion exchange chromatography has proved to be advantageous for the use of these enzymes in applications in the food industry.



**Raniele Oliveira Alves, Matheus Henrique Gouveia Gomes, Osmar Soares da Silva, Tatiana Souza Porto**

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns  
E-mail: ranieleoliveira@outlook.com

Contato principal

**Raniele Oliveira Alves** <sup>1</sup>



**Palavras chave:** Enzimas proteolíticas; fungos filamentosos; purificação de proteínas

**Keywords:** Proteolytic enzymes; filamentous fungi; protein purification



## INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que catalisam reações hidrolíticas, onde as moléculas de proteínas são degradadas a peptídios e aminoácido (SALES et al; 2013). Demonstram grande destaque na indústria de alimentos devido à sua influência na composição, no processo e na deterioração dos alimentos (MONTEIRO; SILVA, 2009). Essas enzimas podem ser obtidas através de fontes animais, vegetais e microbianas, onde os microrganismos apresentam vantagem em relação aos demais como independência de sazonalidade, produção em larga escala com controle de temperatura e pH, além de utilização de substrato baratos como resíduos agrícolas. (NELSON, 2014).

Na perspectiva da biotecnologia, as proteases são o principal grupo de enzimas devido as suas diversas aplicações, principalmente na indústria de alimentos, tais como no amaciamento de carnes, na coagulação do leite para produção de queijos, na panificação, entre outros (ORLANDELLI, 2012). Atualmente, o volume de negócios de enzimas movimenta em torno de US\$ 5 bilhões em diferentes tipos de mercados sendo que 75% da produção mundial de enzimas é destinada a indústria de alimentos (ARZU, 2015).

As proteases podem ser obtidas por meio de processos fermentativos, que do ponto de vista da biotecnologia se dá pela transformação de um substrato em um determinado produto pela ação de microrganismos. Este processo é dividido em duas etapas: as operações de *upstream* que consiste nos processos pré-fermentativos seguida das operações de *downstream* onde ocorre a obtenção do produto. Nestes processos de pós-fermentação incluem separação, filtração, centrifugação e purificação utilizando métodos cromatográficos (ORLANDELLI et al., 2012). A cromatografia é um método amplamente empregado e que permite a separação, identificação e determinação de compostos químicos em moléculas complexas. As separações cromatográficas envolvem, invariavelmente, o transporte dos componentes de uma mistura através de uma coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Na cromatografia de troca iônica, a fase estacionária é altamente carregada, e solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. O método é baseado no princípio da reversibilidade das atrações eletrostáticas de uma molécula carregada em relação a uma matriz sólida com grupos com cargas opostas e ligados covalentemente à matriz (MANERA; MEINHARDT; KALIL; 2011). Os solutos adsorvidos podem ser subsequentemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária ou por variação de pH (IWASHITA, 2012). Diante do exposto o presente trabalho teve como objetivo desenvolver o processo de purificação de proteases de *Aspergillus tamarii* URM4634 por cromatografia de troca iônica.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### *Micro-organismo*

Utilizou-se o fungo filamentosso *Aspergillus tamarii* URM4634 oriundo da Coleção de Culturas Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. A linhagem fúngica foi mantida em meio BDA (Batata Dextrose Agar) em óleo mineral a temperatura ambiente.

### *Produção de proteases por fermentação submersa*

As proteases foram produzidas utilizando o meio de cultura denominado MS-2 descrito por Porto et al., (1996). A constituição do meio para 100 mL de água destilada foi de: 50 mL de filtrado de soja (4%), NH<sub>4</sub>Cl (0,1%), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,06%), extrato de levedura (0,1%), glicose (1%), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,435 %) e 1 mL de solução mineral (100 mg de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 100 mg de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 100 mg de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e água destilada q.s.p. 100 mL). Os frascos Erlenmeyer foram colocados no agitador orbital com controle de temperatura, tipo *shaker*, a 130 rpm a 30 °C por 72 horas.

### *Determinação de atividade proteásica e de proteínas totais*

O método para a determinação da atividade proteásica foi realizada pelo método de Ginther (1979) modificado, que consiste na utilização de 150 µL da amostra com 250 µL de azocaseína 1%. Uma unidade de atividade da protease foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a 0,1 em 1 hora, a 420nm, sendo expressa em U/mL.

Para determinação do teor de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976), que utiliza *Coomassie Brilliant Blue G-250* como corante e Albumina de Soro Bovino (BSA) como padrão. A atividade específica foi calculada como a proporção de atividade proteolítica (U/mL) à concentração total de proteína na amostra (mg/mL) e expressa em U/mg.

### *Purificação de proteases por resina de troca iônica e catiônica*

A purificação foi realizada utilizando diferentes tipos de resina de troca iônica: aniônica DEAE-Sephadex A-50 em tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e catiônica (CM-Sephadex C-50) em tampão Fosfato-Citrato de Sódio, 20 mM pH 5,0. A coluna (5,0 x 1,0 cm) foi empacotada com a resina a temperatura ambiente, e o fluxo ajustado manualmente 1 mL/min. Posteriormente, a amostra foi eluída da coluna, com NaCl à 0,5 M. As frações coletadas foram analisadas a absorbância de 280nm.

### *Eletroforese em gel de poliacrilamida*

A eletroforese foi realizada utilizando um gel de execução de poliacrilamida a 12% de acordo com o método de Laemmli (197). Os padrões de peso molecular utilizados foram as proteínas: fosforilase b (94,0 kDa), albumina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina

(14,4 kDa).

Após a eletroforese o gel foi submetido a uma lavagem e posteriormente mantido por 30 minutos numa solução corante contendo 0,25% de azul de Coomassie R-250 em 45,44% de metanol, 9,08% de ácido acético em água deionizada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Produção de Proteases por *Aspergillus tamarii* URM4634

O micro-organismo *Aspergillus tamarii* URM4634 apresentou ótimo crescimento em meio MS-2, tendo como atividade máxima (60,3 U/mL) após 72 horas. O extrato bruto oriundo da fermentação foi submetido a um processo de pré-purificação, sendo submetido a uma precipitação cetônica e por sulfato de amônia.

Para promover o processo de purificação com base nos

dados das precipitações, realizaram-se ensaios enzimáticos de adsorção da protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 em diferentes resinas de troca iônica, conforme pode ser observado nas Figuras 1 e 2. A análise do teste de adsorção em resinas de cromatografias de troca iônica e aniônica permitiu a definição do protocolo de purificação para protease

### Precipitação cetônica e sulfato de amônio

O extrato bruto foi submetido a uma precipitação de proteínas por meio da adição de sulfato de amônio de modo a atingir uma saturação de 100%. A precipitação com sulfato de amônio seguida de diálise resultou na recuperação de aproximadamente 5,8% da atividade proteolítica presente no extrato bruto e não apresentou purificação na fração 60-80% como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Precipitação de protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 por sulfato de amônio.

Fração	Vol. (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg)	Total	AP (U/mL)	AP (U)	AE (U/mg)	Y(%)	FP
EB	200	0,06	11,9		60,3	12053,3	1015,4	100,0	1,0
0-20%	2,75	0,03	0,1		32,2	88,6	1177,3	0,7	1,2
20-40%	2,7	0,05	0,1		33,2	89,6	633,6	0,7	0,6
40-60%	2,3	0,19	0,4		51,8	119,1	278,0	1,0	0,3
60-80%	6	0,50	3,0		117,2	703,2	234,0	5,8	0,2
80-100%	4	0,20	0,8		96,2	384,7	488,5	3,2	0,5

EB – Extrato bruto; FP – Fator de purificação; Y – Recuperação; AP – Atividade proteásica; AE – Atividade específica.

Embora o maior fator de purificação tenha sido na fração 0-20%, a recuperação nessa faixa foi muito baixa 0,7% indicando que não é vantajoso utilizar essa fração para posteriores etapas. A precipitação por acetona apresentou resultados mais satisfatórios com relação a recuperação, como pode ser observado na Tabela 2.

### Purificação de proteases por resina de troca catiônica CM-Sephadex

A Figura 1 ilustra o perfil de eluição da protease utilizando resina de troca catiônica CM-Sephadex. Observa-se que a enzima foi coletada nas primeiras frações ainda antes do início do gradiente salino, sugerindo que nestas condições de pH a referida enzima não adsorveu na resina de troca catiônica.

Observou-se que em pH 8,0 a enzima não se encontra abaixo do ponto isoelétrico, ou seja, positivamente carregada para interagir com a resina CM-Sephadex. O mesmo comportamento foi observado por Corrêa (2009) ao purificar parcialmente protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp P17.

### Purificação de proteases por resina de troca iônica DEAE-Sephadex

Como pode ser observado na Figura 2, a protease demonstrou afinidade pela resina DEAE-Sephadex ficando assim adsorvida, sendo retirada em maior parte na presença do eluente à 0,5M de NaCl. Para a eluição, as condições de adsorção da coluna (pH ou força iônica) são alteradas para neutralizar a interação entre as proteínas e a resina.

Ao final do processo de purificação, a enzima foi purificada 4,4 vezes com uma recuperação de 24,30% e com uma atividade específica de 4485,71 U/mg. Os resultados da purificação estão descritos na Tabela 2.

A protease purificada apresentou uma banda, como mostra o perfil eletroforético na Figura 3, confirmando assim a purificação, e também determinar o peso molecular da enzima correspondente a 43,9 KDa. A enzima apresentou peso molecular superior ao obtido por Silva (2011) quando utilizou protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* e purificada por filtração em gel, que foi de aproximadamente 33 kDa.

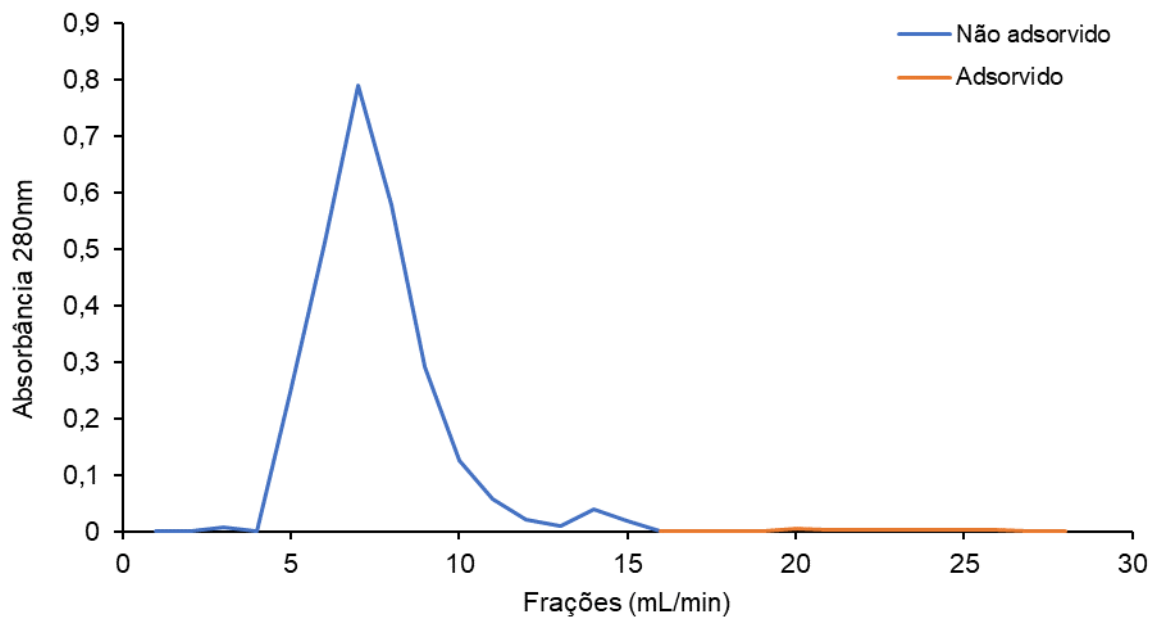


Figura 1. Perfil cromatográfico do processo de purificação da protease *Aspergillus tamaritii* URM4634 pela resina CM-Sephadex de troca catiônica.

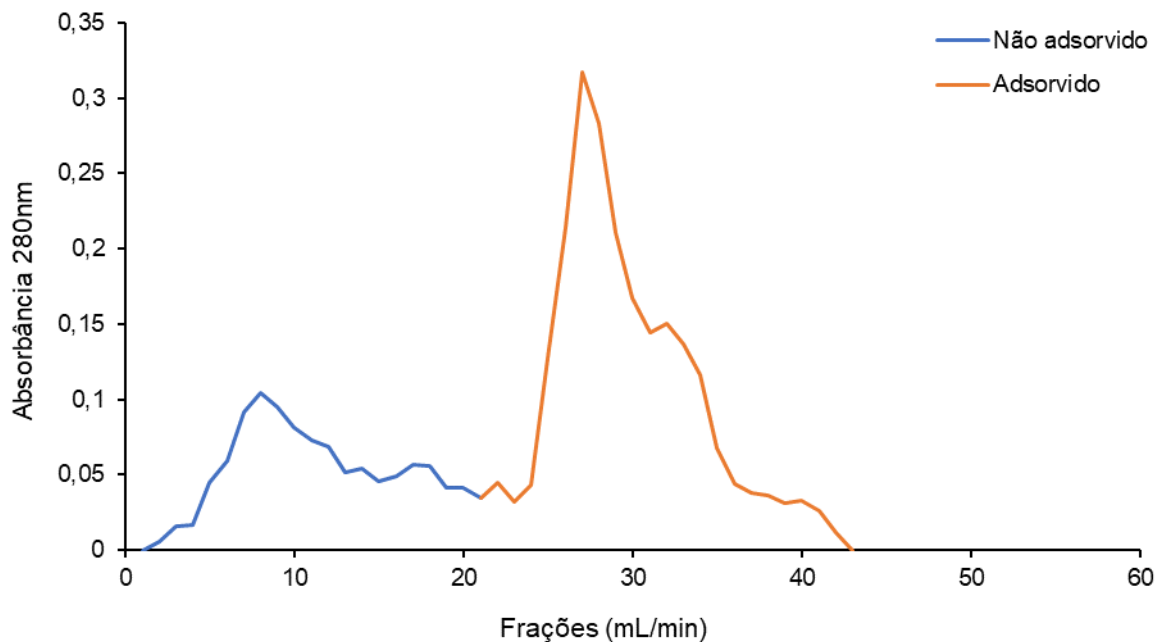


Figura 2. Perfil cromatográfico do processo de purificação da protease *Aspergillus tamaritii* URM4634 pela resina DEAE-Sephadex com gradiente 0,5M de NaCl.

Tabela 2. Resultados da purificação de protease de *Aspergillus tamaritii* URM4634.

	Vol. (mL)	Proteína (mg/mL)	Total	AP (U/mL)	AE (U/mg)	Y (%)	FP
Extrato Bruto	15	0,06	60,30	1015,40	1015,40	100	1,00
Precip. Cetônico	2	0,16	87,33	430,90	430,90	19,31	0,42
DEAE-Sephadex	7	0,007	31,40	4485,71	4485,71	24,30	4,41

FP – Fator de purificação; Y – Recuperação; AP – Atividade proteásica; AE – Atividade específica.

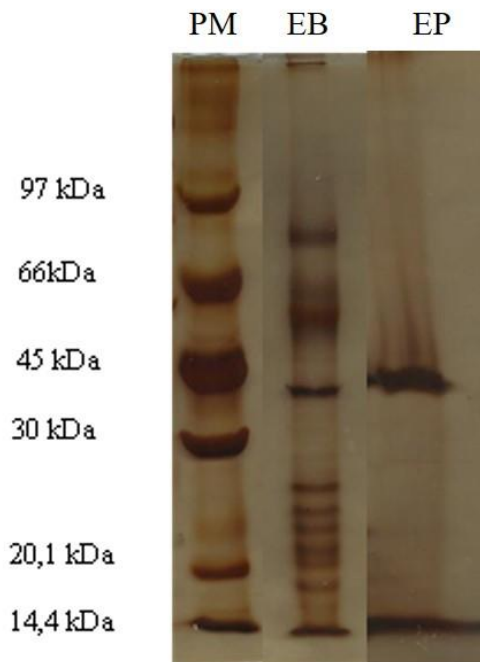


Figura 3 Eletroforese em gel de poliacrilamida da protease de *Aspergillus tamaris* URM4634 em Fermentação Submersa. Da esquerda para direita: padrões moleculares (PM), extrato bruto (EB) e enzima purificada (EP).

## CONCLUSÃO

A produção de proteases por fermentação submersa utilizando o micro-organismo *Aspergillus tamaris* URM4634 mostrou-se muito vantajosa com uma produção média de 60,3 U/mL após 72 horas. A resina de troca aniônica DEAE-Sephadex apresentou maior afinidade, onde a protease obteve uma melhor adsorção aumentando seu fator de purificação em 4,4 vezes. Após a obtenção do perfil eletroforético, pode-se confirmar a purificação e determinar o peso molecular da enzima correspondente à 43,9 KDa. Assim a purificação por cromatografia de troca iônica mostrou-se vantajosa para utilização destas enzimas em aplicações na indústria de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento e todo apoio durante o desenvolvimento das atividades.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARZU, U. Production of  $\alpha$ -amylase from some thermophilic *Aspergillus* species and optimization of its culture medium and enzyme activity. *African Journal of Biotechnology*, v. 14, n. 47, p. 3179–3183, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–54, 1976.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Unicamp, 2006, p. 456.

CORRÊA, A. P. F. **Purificação parcial e caracterização de uma protease alcalina queratinolítica de *Bacillus* sp. P7**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Porto Alegre - RS, 2009.

GINTHER, C.L.; Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol 15, n. 4, p. 522-526, 1979.

IWASHITA, C. **Novas estratégias de purificação dos fatores de coagulação Fator VIII e Proteína C a partir de plasma humano empregando cromatografia líquida**. 2012. 142 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

LAEMLLI, U. K.; Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685, 1970.

SALES A. E.; SOUZA F. A. S. D.; TEIXEIRA J. A.; PORTO T. S.; PORTO A. L. F.; Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. **Appl Biochem Biotechnol**, 170, 1676-1688, 2013

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2011.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **SaBios: Rev. Saúde e Biol**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

MANERA, A. P.; MEINHARDT, S.; KALIL, S. J. **Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger***. Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 2, p. 651-658, abr/jun. 2011

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. D. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, p. 9–23, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 1996.