



ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Aspergillus niger* EM MEIO SUPLEMENTADO COM HEMÁCIA SUÍNA

Camila Maffessoni¹, Fabiane Paula Werlang Schuster,² Liziane Schittler³, Aniela Pinto Kempka⁴

¹ Acadêmica do Curso de Engenharia de Alimentos – UDESC Oeste – bolsista PIVIC/UDESC.

² Acadêmica do Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – UDESC Oeste

³ Pesquisadora participante, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – UDESC Oeste.

⁴ Orientadora, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – UDESC Oeste – aniela.kempka@udesc.br

Palavras-chave: *Aspergillus niger*. Protease. Hemácia.

As proteases ocupam um papel importante nos processos fisiológicos e podem ser produzidas naturalmente através das plantas, porém, a produção natural é muito demorada, comparando com a demanda mundial por esta classe de enzimas. Devido a isto, vem se estudado diferentes e novas formas de produção de proteases e se sabe que essas enzimas podem ser produzidas através do processo de fermentação, feito por microrganismos, sendo uma opção economicamente viável em escala industrial. Os fungos filamentosos, especialmente o *Aspergillus niger*, são considerados ótimos produtores de enzimas extracelulares. Diante desta característica do *Aspergillus niger*, objetivou-se avaliar a produção de protease extracelular em meio suplementado com leite, plasma e hemácia usando duas cepas diferentes (*A. niger* 1 e *A. niger* 2), do estoque do Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química da UDESC Oeste. O método utilizado foi a avaliação da formação de halo translúcido em volta do micélio quando há crescimento do microrganismo em meio composto por 2% de Ágar, 1% de gelatina e suplementado com uma das seguintes fontes de nitrogênio: 1% leite desnatado sem lactose, 1% plasma suíno desidratado ou 1% hemácia suína desidratada. Após esterilização do meio, adicionou-se o suplemento e ajustou-se o pH do meio para 5,0. Inoculou-se 1 μ L de 10^8 esporos/mL no centro das placas e estas foram incubadas a 28 °C em estufa BOD. Mediú-se o halo formado a cada 24 horas durante 120 horas. Avaliou-se também a produção de protease é através do IE (Índice Enzimático), obtido pela relação do diâmetro do halo pelo diâmetro do micélio, caracterizado por ser um método semiquantitativo, sendo considerado como boa atividade proteolítica o IE superior a 2,0. A Fig. 1 representa o desenvolvimento e formação de halo de ambos os microrganismos testados. Pode-se visualizar a formação de um micélio central com esporos (região mais escura) contornado por um halo de hifas (região mais clara). No meio contendo a hemácia (Fig. 1A e 1B), observa-se a formação de um halo rosado devido a hidrólise proteica e no meio contendo leite (Fig. 1C e 1D), o halo é menos característico e discreto. A Fig. 2 apresenta os IE's correspondentes as médias das medidas efetuadas a cada 24 horas. Verifica-se que o *A. niger* 1 manifestou atividade proteolítica

após 72 horas no meio suplementado com leite ou hemácia, enquanto que o *A. niger* 2 apresentou formação de halo após 96 horas, apenas no meio suplementado com hemácia.

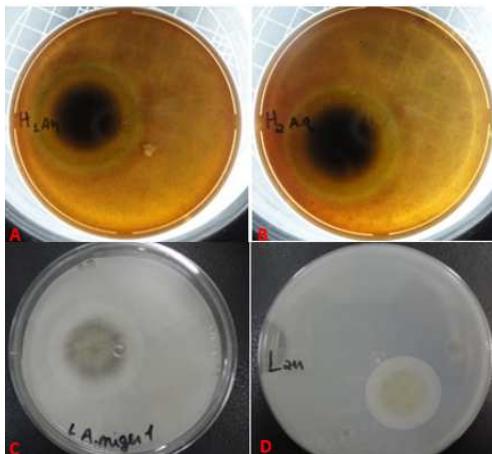


Fig.1: Formação de halo. A) *A. niger* 1 + hemácia B) *A. niger* 2 + hemácia C) *A. niger* 1 + leite D) *A. niger* 2 + leite.

Após 120 horas de incubação, o *A. niger* 1 ultrapassou o IE superior a 2,0, podendo ser considerado um microrganismo com boa produção de protease no meio enriquecido com hemácia. O fungo *Aspergillus niger* já é estudado como produtor de protease extracelular em meio suplementado com leite, apresentando IE's acima de 2,0 em muitos estudos (GNANADOSS, ROBERT, JEBAPRIYA, 2011; RODARTE et al., 2011). Para os meios suplementados com o plasma não foi evidenciada atividade proteolítica de ambas as cepas de *A. niger*. O plasma apesar de ser rico em teor proteico, apresentou baixa solubilidade no meio, o que o torna pouco assimilável como fonte de nitrogênio pelo fungo. Além disso, os linfócitos e monócitos, responsáveis pela resposta imune (inclusive de suínos) permanecem na fração de plasma do sangue, e podem ter atuado como inibidores. Imunoglobulinas que atuam sobre patógenos também estão presentes no plasma (DALTO et al., 2013) e tem atividade antimicrobiana. Por outro lado as hemácias, não tem esta característica, devendo ser esta a razão do comportamento distinto de ambos os fungos mediante suplementação com diferentes frações sanguíneas. O halo avaliado neste trabalho é resultado da atividade de proteases excretadas pelo fungo no meio. No entanto, há necessidade de estudos mais abrangentes para preencher a lacuna de informações acerca da aplicação do plasma e hemácias como fonte de nitrogênio metabolizável por fungos filamentosos e a ação hidrolítica de proteases fúngicas sobre as proteínas presentes nas frações do sangue. Conclui-se, que hemácia suína pode ser utilizada como meio ou suplemento para estimular o fungo *Aspergillus niger* a produzir protease extracelular.

Referências

- DALTO, D.B.; GAVIOLI, D.F.; OLIVEIRA, E.R.; SILVA, R.A.M.; TARSITANO, M.A.; ALTMANN, Á.H.S. BRAZ, D.B.; KOBAYASHI, R.K.T.; VENÂNCIO, E.J.; BRIDI, A.M.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; SILVA, C.A. Efeito de dietas contendo plasma sanguíneo desidratado sobre características microbiológicas, imunológicas e histológicas de leitões leves ao desmame. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 65, n. 1, p. 189-197, 2013.
- GNANADOSS, J.; ROBERT, J. R.; JEBAPRIYA, G. R. Production of protease from *Aspergillus niger* and *Mucor mucedo* under submerged and solid state fermentation. *International Journal of Current Research*, v. 3, p. 75-78, 2011.
- RODARTE, M. P.; DIAS, D. R.; VILELA, D.M.; SCHWAN, R. F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum - Agronomy*, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

Microrganismo + suplemento	24h	48h	72h	96h	120h	144h
<i>A. niger</i> 1 + leite	0	0	1,60	1,61	1,69	1,69
<i>A. niger</i> 1 + plasma	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger</i> 1 + hemácia	0	0	1,53	1,83	2,16	1,64
<i>A. niger</i> 2 + leite	0	0	0	0	1,83	1,56
<i>A. niger</i> 2 + plasma	0	0	0	0	0	0
<i>A. niger</i> 2 + hemácia	0	0	0	1,83	1,53	1,26

Fig. 2: Quadro dos valores de IE ao longo do tempo de crescimento do *Aspergillus niger*.