



PRODUÇÃO DE PROTEASE POR *Aspergillus clavatus* EM MEIO FORMULADO COM BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO COM PLASMA OU HEMÁCIA SUÍNOS

Camila Maffessoni¹, Fabiane Paula Werlang Schuster², Aniela Pinto Kempka³

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

² Mestranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - UDESC.

³ Orientadora, Departamento de Engenharia de Alimentos e Engenharia Química – UDESC Oeste – aniela.kempka@udesc.br.

Palavras-chave: *Protease. Plasma. Hemácia.*

Proteases são enzimas que catalisam reações com proteínas e podem ser extraídas de plantas, animais e micro-organismos. A produção microbiana possibilita a obtenção de enzimas específicas, com elevado índice de pureza, baixo custo de produção, ótima estabilidade, seguindo preceitos de sustentabilidade e com mínimo impacto ambiental, especialmente ao usar como substrato, suplemento e suporte de crescimento resíduos agroindustriais (SCHUSTER e KEMPKA, 2017). O uso de fungos para produzir proteases é vantajoso, pois grande parte das cepas usadas são consideradas geralmente seguras (GRAS). O micélio pode ser removido por filtração, e os fungos adaptam a variações de pH e temperatura, requerem baixa atividade de água e assimilam nutrientes de fontes complexas (BENLUVANKAR; JEBAPRIYA; GNANADOUSS, 2015; CASTRO; SATO, 2015; GNANADOUSS; ROBERT; JEBAPRIYA, 2011). A fermentação de substratos com elevado teor proteico e baixa relação C:N ou suplementação com fontes de proteína/nitrogênio resultam em aumento da produção de proteases por fungos (BENLUVANKAR; JEBAPRIYA; GNANADOUSS, 2015). O sangue é um subproduto gerado nos frigoríficos cuja aplicação é restringida na indústria alimentícia por questões sanitárias, legais e limitações especialmente pela coloração. O sangue cru pode ser separado, após a centrifugação, em uma fração de plasma que contém até 85% em base seca de proteína hidrosolúvel e uma fração de hemácias (glóbulos vermelhos) que quando desidratada consiste principalmente de proteína (90-95%), dentre elas a hemoglobina que contém em sua estrutura íons de Fe²⁺ (DEL HOYO; RENDUELES; DÍAZ, 2008; LAFARGA; ÁLVAREZ; HAYES, 2017; TOLDRÀ et al., 2008). O bagaço de malte absorve grande quantidade de água, tem a granulometria heterogênea ideal para evitar compactação do meio e possibilitar maior superfície de contato para aproveitamento dos nutrientes pelos micro-organismos e a casca presente é um bom meio para fixação de fungos filamentosos (MATHIAS; MELLO, 2014). Nesse contexto, o objetivo desta pesquisa foi usar plasma e hemácias suíños desidratados como suplementação proteica de meio a base de bagaço de malte para produzir protease por FES usando o fungo filamentoso *Aspergillus clavatus*. A FES foi conduzida usando 9g de meio a base de bagaço de malte suplementado com 1g de plasma ou hemácia (10%) e umidade padronizada para 65%, adição de 1 mL de inóculo

com 10^6 esporos/mL e mantida a 28°C por 72h. A atividade proteasica do extrato obtido foi determinada usando como substrato da reação azocaseína 0,5% dissolvida em tampão acetato de sódio 0,2M pH 5,0 e incubando-se partes iguais de extrato e azocaseína 0,5% por 40 minutos a 37°C, segundo Charney e Tomarelli (1947) com modificações segundo Souza (2015). Obteve-se atividade proteasica de $1726,7 \pm 35,3$ U.mL $^{-1}$ no meio suplementado com plasma e $1730,0 \pm 21,2$ U.mL $^{-1}$ no meio suplementado com hemácia. Ambos os meios resultaram na produção de protease com elevada atividade, não diferindo estatisticamente pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%. Esta atividade é superior a relatada por Hajji et al., (2008) que obteve atividade de 770,66 U.mL $^{-1}$ após otimizar condições de produção em meio suplementado com sementes da planta *Mirabilis jalapa* desidratada com a mesma espécie de fungo (*A. clavatus*). Silva et al., (2011) determinou a atividade de protease excretada por *A. clavatus* usando hemoglobina como substrato da reação e obteve incremento de 37,2 vezes na atividade após purificação, chegando a 133,9 U. μ g $^{-1}$ como atividade específica da enzima purificada obtida pela fermentação submersa de meio composto por glicose e gelatina como fonte de nitrogênio. Outros autores que estudaram diferentes suplementos com fungos do gênero *Aspergillus* obtiveram extratos com boa atividade proteolítica, porém ainda menor que a encontrada neste estudo. Cito Siala et al. (2012) que produziram protease por *A. niger* em meio suplementado com peptona de camarão, peptona de carne ou peptona de caseína com atividade de 82,3 U.mL $^{-1}$, 72,67 U.mL $^{-1}$ e 71,63 U.mL $^{-1}$, respectivamente. Conclui-se que o meio formulado com bagaço de malte suplementado com plasma ou hemácia suínos é uma alternativa promissora para produção de protease com elevada atividade pelo fungo *Aspergillus clavatus*.

REFERÊNCIAS

- BENLUVKANKAR, V.; JEBAPRIYA, G. R.; GNANADOUSS, J. J. Protease Production By *Penicillium Sp*. Lcj228 Under Solid State Fermentation Using Groundnut Oilcake As Substrate. *International Journal of Life science & Pharma Research*, v. 5, n. 1, p. 12–19, 2015.
- CASTRO, R. J. S. DE; SATO, H. H. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization. *Waste and Biomass Valorization*, v. 6, n. 6, p. 1085–1093, 2015.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. Proteolytic activity of duodenal juice. *Journal of Biological Chemistry*, v. 171, p. 501–505, 1947.
- DEL HOYO, P.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Science*, v. 78, n. 4, p. 522–528, 2008.
- GNANADOUSS, J.; ROBERT, R.; JEBAPRIYA, 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.
- HAJJI, M. et al. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 79, n. 6, p. 915–923, 2008.
- LAFARGA, T.; ÁLVAREZ, C.; HAYES, M. Bioactive peptides derived from bovine and porcine co-products: A review. *Journal of Food Biochemistry*, v. 41, n. 6, p. 1–18, 2017.
- MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M. DE. Caracterização de resíduos cervejeiros. *COBEQ XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, p. 1–8, out. 2014.
- SHUSTER, Fabiane Paula Werlang.; KEMPKA, Aniela Pinto. Resíduos agroindustriais como meio sustentável para produção de protease microbiana. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIA, SAÚDE E TERRITÓRIO, 4., 2017, Lages – SC. Anais eletrônicos...Lages: UNIPLAC, 2017. Disponível em: <http://www.simpisioppgas.com.br>. Acesso em: 01 jul. 2018.
- SILVA, T. A. S. E et al. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 27, n. 11, p. 2491–2497, 2011.
- SOUZA, P. M. DE. *Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro*. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- TOLDRA, M. et al. Functional and quality characteristics of the red blood cell fraction from biopreserved porcine blood as influenced by high pressure processing. *Meat Science*, v. 80, n. 2, p. 380–388, 2008.