

Avaliação da produção de protease utilizando planejamento fatorial por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

J. M. SILVA¹, T. S. PORTO², A.L.F. PORTO¹ e C.S. PORTO¹

¹ Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA)

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade de Garanhuns (UAG)
E-mail para contato: milasporto@yahoo.com.br

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi selecionar as condições mais adequadas para a produção de protease utilizando planejamento fatorial pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573. As variáveis de produção (concentrações da fonte de carbono- 0g/L; 0,5 g/L; 1,0 g/L, de nitrogênio-0,5%; 1,0%; 1,5%; agitação- 150, 200 e 250 rpm; temperatura- 28, 32 e 37°C) foram determinadas e analisadas por um planejamento fatorial 2⁴ tendo como variável resposta produção de protease e biomassa celular. Foi verificado que as variáveis independentes que mais influenciaram na produção foram a temperatura e agitação, sendo o ensaio 3 selecionado (0,5% de farinha de soja, 1,0g/L de glicose em 150 rpm a 28°C) com 347 U/mL. A maior atividade proteásica foi obtida em 48 horas. Logo, a bactéria filamentosa *Streptomyces parvulus* DPUA 1573, apresentou atividade proteásica significativa podendo ser inserida no mercado enzimático.

1. INTRODUÇÃO

As proteases são enzimas diversificadas, representam um dos maiores grupos de enzimas industriais. A sua função é de hidrolisar ligações peptídicas para fins industriais, apresentam fácil capacidade de manuseio e mais rentável em razão de suas diferentes aplicações nas indústrias biotecnológicas, sendo um fator que facilita o fomento às pesquisas científicas com as proteases. (Li *et al.*, 2013).

Estes tipos de enzimas apresentam diferentes fontes, no entanto as proteases microbianas se destacam no meio científico devido à sua capacidade metabólica celular ser considerada de baixo custo, facilitando no aumento de escala e no crescimento em um curto espaço de tempo, sem depender da sazonalidade produtora. Muitos micro-organismos produzem estas proteases, porém as bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* merece destaque por serem conhecidas cientificamente pelo seu potencial na produção de biocompostos de interesse industrial, como antibióticos, ácido clavulânico e enzimas (Awad *et al.*, 2013; Dubey e Prasad *et al.*, 2014; Mostafa *et al.*, 2012).

Portanto, esta pesquisa teve por objetivo analisar e selecionar os parâmetros mais adequados para obter maiores rendimentos na produção de protease de interesse industrial por *Streptomyces*

parvulus. DPUA 1573 isolado de líquen da Região Amazônica, utilizando um planejamento estatístico.

2. Material e Métodos

2.1 Micro-organismo

A linhagem *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 foi isolada de líquen da Região Amazônia. Para a sua reativação foi utilizado o meio de cultivo ISP2 (Pridham *et al.*, 1957), na temperatura de 28°C a 200 rpm por 48 horas.

2.2 Meio para produção proteases pelo *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Para a produção foi utilizado o meio MS-2 (Porto *et al.*, 1996), a autoclavagem do meio de cultivo foi a 121°C, a 1 atm de pressão, durante 30 minutos. O crescimento celular e produção de protease foram analisados a cada 24 horas até 120 horas.

2.3 Planejamento fatorial para a produção de protease por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573

Os estudos de produção foram realizados com um auxílio de um planejamento fatorial completo 2^4 com 4 pontos centrais. Sendo como fatores avaliados, as concentrações de fontes de nitrogênio e de carbono, agitação e temperatura, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^4 na produção de protease

Variáveis	Níveis		
	Menor (-1)	Central	Maior (+1)
Farinha de soja (%)	0,5	1	1,5
Glicose (g/L)	0	0,5	1
Agitação (rpm)	150	200	250
Temperatura (°C)	28	32	37

2.4 Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi estudado pela densidade óptica das amostras ao comprimento de onda a 600 nm, em espectrofotômetro (Bel Protonics- SP 2000 UV). Como também por peso seco, o conteúdo do frasco foi filtrado em papel filtro seco previamente pesado, em seguida o papel de filtro juntamente com a massa celular foi levado em micro-ondas na potência baixa por 10 minutos (Olsson e Nielsen, 1997).

2.5 Atividade proteásica

A atividade proteásica foi analisada de acordo com a metodologia de Ginther, 1979 modificado, que consiste na mistura de azocaseína a 1% com 0,2M de TRIS-HCL no pH 7,2 juntamente com 200µL do líquido metabólito livres de células, os ensaios foram analisados por espectrofotometria na absorvância de 420 nm.

3. Resultados e Discussão

Na Tabela 2 estão apresentados os valores da atividade proteásica do planejamento fatorial realizado no tempo de 48 horas, pode-se verificar que a produção de protease ocorreu em todas as condições do planejamento fatorial.

Das variáveis independentes estudadas (concentração das fontes de carbono e nitrogênio, temperatura e agitação), as que influenciaram significativamente a produção de protease foram a temperatura e agitação, visualizado no gráfico de Pareto (Figura 1). De acordo com a Figura 1, o aumento da temperatura e agitação tem efeito negativo nos valores de atividade proteásica, no entanto a interação dessas variáveis foi positiva, onde os valores de temperatura e agitação diminuindo conjuntamente aumenta a atividade proteásica, porém as variáveis independentes concentrações de nitrogênio e carbono não foram estatisticamente significativas: a agitação aumenta a taxa de oxigênio e a transferência de nutrientes para as células bacterianas como também resulta na degradação de proteases, devido à lise celular ou permeabilidade celular excessiva relacionada à abrasão por forças de cisalhamento e limitação de oxigênio; a temperatura afeta diretamente na síntese de proteases influenciando as reações bioquímicas (Rahman *et al.*, 2005). Neste caso específico, a temperatura e a agitação foram os fatores determinantes para a causa da repressão na produção de protease, ou seja, quando comparados os ensaios 7, 11 e 15 com o ensaio 3, percebe-se que houve um maior valor em atividade proteásica (347 U/mL).

Nesta pesquisa, foram estudadas três temperaturas (28°C; 32°C; 37°C) e três valores de agitação (150 rpm; 200 rpm; 250 rpm), o maior grau de atividade proteolítica foi em 28°C e a agitação de 150 rpm, resultado este oposto ao relatado por Bajaj *et al.* (2011) cultivou a linhagem *Streptomyces* sp. DP2 na temperatura de 45°C em 250 rpm para produção de protease, tendo valores inferiores em comparação a este trabalho. Similar ao observado na pesquisa de El-Shafei *et al.* (2010) trabalhando com a bactéria *Streptomyces albidoflavus* na produção de protease alcalina em 37°C a 170 rpm.

Tabela 2. Resultados da produção de protease por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 com 48 horas de fermentação

Ensaio	Soja (%)	Glicose (g/L)	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	U/mL
1	0,5	0	28	150	174
2	1,5	0	28	150	180,6
3	0,5	1,0	28	150	347
4	1,5	1,0	28	150	65,6
5	0,5	0	37	150	37,3
6	1,5	0	37	150	69,3
7	0,5	1,0	37	150	10,3
8	1,5	1,0	37	150	45,6
9	0,5	0	28	250	43,3
10	1,5	0	28	250	49,3
11	0,5	1,0	28	250	44,3
12	1,5	1,0	28	250	34,3
13	0,5	0	37	250	33,3
14	1,5	0	37	250	30
15	0,5	1,0	37	250	20,6
16	1,5	1,0	37	250	34,6
17 C	1,0	0,5	32	200	155,6
18 C	1,0	0,5	32	200	110,3
19 C	1,0	0,5	32	200	129
20 C	1,0	0,5	32	200	114,6

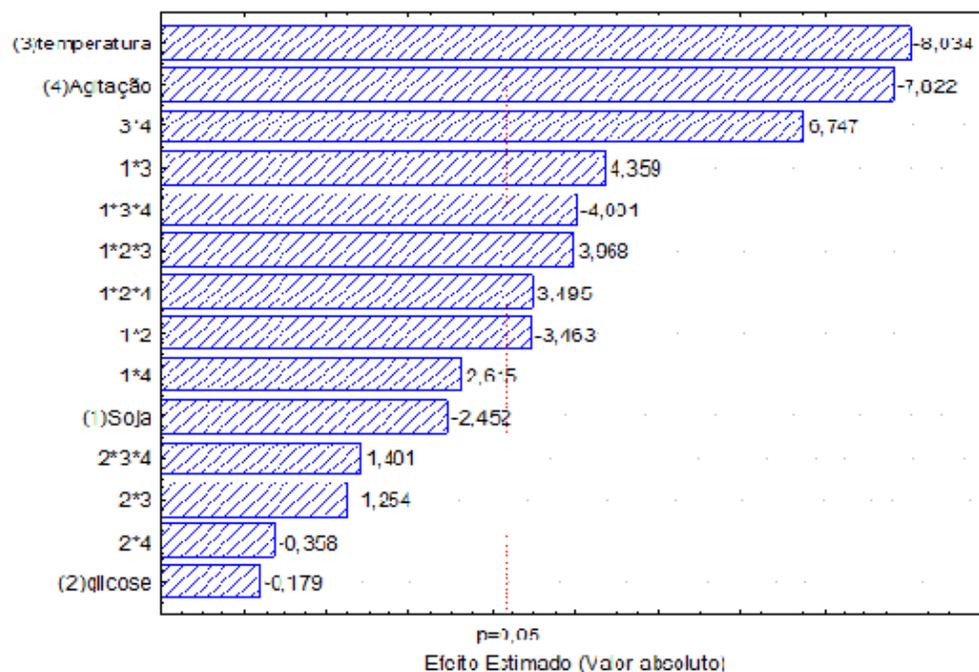


Figura 1 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis para produção de protease. (1) concentração de soja; (2) concentração de glicose; (3) temperatura; (4) agitação.

Em conformidade com o crescimento celular e ao tempo de produção, foi observado que em 24 horas de fermentação submersa ocorreu um início da produção de protease. De acordo com os resultados apresentado na Figura 2, a maior disponibilidade de nutrientes nas primeiras horas de cultivo deve-se pela presença de um pré-inóculo que reativa o micro-organismo de interesse, possibilitando assim, obter o maior valor de biomassa no menor tempo. O tempo de produção que apresentou os melhores resultados foi com 48 horas de crescimento; após este período foi verificado o contínuo decréscimo de atividade até 120 horas de fermentação e também o crescimento microbiano.

Lazim *et al.*, (2009) estudando a linhagem *Streptomyces* sp isolada de solo tunisiano, obteve o melhor tempo de produção com 72 horas de crescimento e Yuratmoko *et al.* (2007), que trabalhou com linhagens de *Streptomyces* sp, afirma que o início da produção ocorreu com 96 horas de fermentação e o seu pico foi com 168 horas. Pode ser verificado que pode haver diversidade de resultados apresentados na literatura com o mesmo gênero, devido a diferença do metabolismo dos *Streptomyces* relatados, em relação ao pico de produção variando de 48 horas a 168 horas, pela influência de diferentes condições de cultivo, tipo e concentração de substrato, temperatura, agitação, pH.

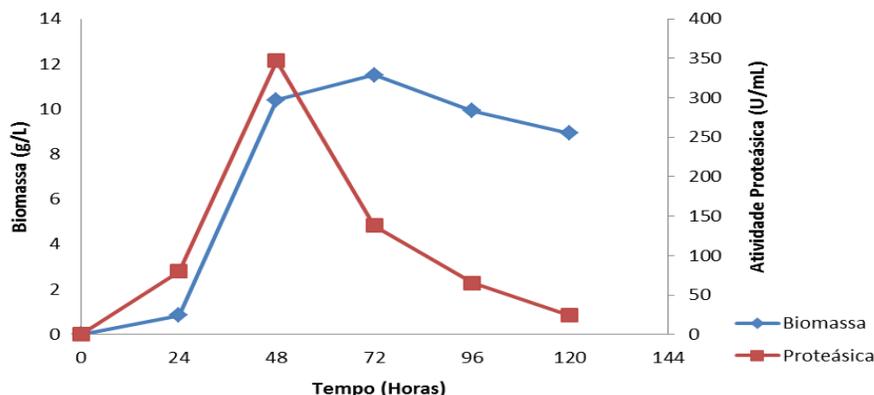


Figura 2 - Gráfico representando o crescimento microbiano da bactéria *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 e sua produção de protease nas condições 0,5% de farinha de soja, 1g/L de glicose a 28°C em 150 rpm.

3. CONCLUSÃO

Com o resultados obtidos foi possível selecionar a condição mais adequada na produção de protease por *Streptomyces parvulus* DPUA 1573 com meio de produção instituído na concentração de 0,5% de farinha de soja (fonte de nitrogênio), 1 g/L de glicose (fonte de carbono), a 150 rpm em 28°C

no tempo de 48 horas de fermentação, com o valor de 347 U/mL de atividade proteásica, sendo favorável o tempo de produção e concentração de soja para a aplicação industrial.

4. REFERÊNCIAS

- ARA, I.; BUKHARI, D.R.; WIJAYANTI, BAKIR, M.A.; V.N. Proteolytic activity of alkaliphilic, salt-tolerant actinomycetes from various regions in Saudi Arabia. *African Journal of Biotechnology*, v. 11(16), p. 3849-3857, 2012.
- AWAD, H.M, MOSTAFA, E.E. SAAD, M.M.; SELIM, M.H.; HASSAN, H.M. Partial purification and characterization of extracellular protease from halophilic and thermotolerant strain *Streptomyces pseudogrisiolus* NC-15. *Indian J. of Biochemistry e Biophysics*, v 50, p. 305-311, 2013.
- BAJAJ, B.K.; SHARMA, P. An alkali-thermotolerant extracellular protease from a newly isolated *Streptomyces* sp. DP2. *New Biotechnology*, v. 28(6), 2011.
- EL-SHAFEI. H.; ABDEL-AZIZ, M.S.; GHALY, M.F, ABDALLA, A.A.H. Optimizing some factors affecting alkaline protease production by a marine bacterium *Streptomyces albidoflavus*. *Proce. of fifth scient. envi. conf.*, 2010.
- GINTHER, C.L. Sporulation and the- Production of Serine Protease and Cephameycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antim. agents and chem.*, v 15 (4), p. 522-526, 1979.
- LAZIM, H.; MANKAI, H.; SLAMA, N.; BARKALLAH, I.; LIMAM, F. Production and optimization of thermophilic alkaline protease in solid-state fermentation by *Streptomyces* sp. CN902. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 36, p. 531–537, 2009.
- MOSTAFA, E.E.; MOATAZA, M.S.; AWAD, M.H.S.; HASSAN, H.M. Optimization conditions of extracellular proteases production from a Newly isolated *Streptomyces pseudogrisiolus* NCR – 15. *E- Journal of Chemistry*, v 9(2), pp. 949-961, 2012.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On Line and *in situ* monitoring of biomass in submerged cultivations. *Trends in Biotech.*, v. 15, p. 517-522, 1997.
- PORTO, A.L.F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J.L. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing soy bean flour médium. *Ap. Biochem. Biotech.*v.60, p.115-122., 1996.
- PRIDHAM, T. G.; ADERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A. Selection of Media for Maintenance and Taxonomic Study of *Streptomyces*. *Antibiot. M.* p.947-953, 1957.
- RAHMAN, R.N.Z.A.; GEOK, L.P.; BASRI, M.; SALLEH, A.B. Physical factors affecting the production of organic solvent-tolerant protease by *Pseudomonas aeruginosa* strain K. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 429–436, 2005.
- RASHMI, D.; PRASAD, R. Biophysical characterization of *in vitro* bound *Streptomyces peucetius* daunorubicin–serine protease complex. *International J. of Biol. Macrom.*, v.64, pp. 111-114, 2014.

VONOTHINI, G.; MURUGAN, M.; SIVAKUMAR, K.; SUDHA, S. Optimization of protease production by an actinomycete STRAI, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African J.l of Biotechnol*, v. 7 (18), pp. 3225-3230, 2008.

YURATMOKO, D.; MUBARIK, N.R.; MERYANDIN, A. N. Screening of proteolytic enzymes of *Streptomyces* sp local strain and their characterization. *Microbiol Indonesia*, v 1, 2007.