

# DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS DA PROTEASE DE *Aspergillus niger* URM 5741

## Resumo:

Proteases são enzimas amplamente utilizadas em processos industriais, sobretudo na indústria de alimentos no amaciamento de carne, panificação e coagulação do leite. É de fundamental importância o conhecimento dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação enzimática, uma vez que estes influem na afinidade da enzima pelo substrato e a velocidade de reação catalítica. O presente trabalho teve como objetivo determinar os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação que envolvem a protease de *Aspergillus niger* URM 5741. A enzima exibiu uma cinética de Michaelis-Menten com  $K_m$  de 8,369 mg/mL,  $V_{max}$  de 5,596 mg/mL/min,  $k_{cat}$  5,419 s<sup>-1</sup> e  $k_{cat}/K_m$  de 0,6475 mL/mg.s. Os parâmetros termodinâmicos da reação catalisada pela protease  $\Delta G_{(E-T)}^\ddagger$  e  $\Delta G_{(E-S)}^\ddagger$  apresentaram valores de 1,088 e 5,319 kJ/mol, respectivamente. A protease de *A. niger* URM 5741 apresentou atividade coagulante do leite e os resultados obtidos no estudo cinético conferem uma indicativa do comportamento em posteriores aplicações.

## Abstract:

Protease enzymes are widely used in industrial processes, especially in the food industry in the tenderization of meat, bread and milk coagulation. It is of fundamental importance study the kinetic and thermodynamic parameters of the enzyme reaction, since these affect the enzyme affinity for the substrate and the catalytic reaction speed. This study aimed to determine the kinetic and thermodynamic parameters of the reaction involving protease from *Aspergillus niger* URM 5741. The enzyme exhibited Michaelis-Menten kinetics with  $K_m$  of 8,369 mg/mL,  $V_{max}$  of 5,596 mg/mL/min,  $k_{cat}$  of 5,419 s<sup>-1</sup> and  $k_{cat}/K_m$  of 0,6475 mL/mg.s. The thermodynamic parameters of the reaction catalyzed by protease  $\Delta G_{(E-T)}^\ddagger$  e  $\Delta G_{(E-S)}^\ddagger$  showed values of 1,088 e 5,319 kJ/mol, respectively. The protease of *A. niger* AN 5741 showed milk coagulating activity and the results from the kinetic study give an indicative behavior in later applications.



**Rodrigo Lira Oliveira<sup>1</sup>,  
Matheus Henrique Gouveia  
Gomes<sup>1</sup>,  
Tatiana Souza Porto<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Graduando do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco

<sup>2</sup>Professora do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns. E-mail: portots@yahoo.com.br

Contato principal:

**Tatiana Souza Porto<sup>2</sup>**



**Palavras chave:** protease extracelular, cinética e termodinâmica

**Keywords:** extracellular protease, kinetics and thermodynamic



## INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que catalisam a reação da hidrólise de proteínas, peptídeos ou aminoácidos livres (MIKHAILOVA, 2011). São amplamente empregadas em produtos e processos industriais tais como panificação, amaciamento de carne, síntese de peptídeos, detergentes, fabricação de cerveja, tratamento de efluentes, diagnóstico médico, tratamento de couro e seda e em fotografia (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

As enzimas proteolíticas podem ser obtidas de origem animal, vegetal e microbiana. Sendo que a produção através de micro-organismos é mais vantajosa, uma vez que não é limitada pela sazonalidade e disponibilidade da matéria-prima para a extração, o que ocorre com as demais fontes de obtenção (ORLANDELLI et al., 2012). Dentre os micro-organismos os fungos se mostram como alternativas interessantes para a produção de proteases, devido ao seu baixo espaço requerido para cultivo e ampla possibilidade de manipulação genética afim de melhorar a produção (ANANDAN; MARMER; DUDLEY, 2007).

Entre os fungos empregados na produção destaca-se o gênero *Aspergillus* que apresenta um enorme potencial para a produção de enzimas, obtendo níveis de atividades enzimáticas superiores aos fungos geralmente considerados como os melhores produtores de proteases. Esses fungos se apresentam de forma ubíqua e apresentam elevados índices de produção em diferentes meios de crescimento (IANDOLO et al., 2011).

Em geral os processos envolvendo reações catalíticas é de fundamental importância o conhecimento do comportamento cinético das enzimas, uma vez que constitui uma informação relativa às taxas de ativação e inativação de enzimas e realmente da velocidade de como um processo ocorre (GHOBADI NEJAD et al., 2014). Diante do exposto o presente estudo teve como objetivo determinar os parâmetros cinéticos ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$ ,  $k_{cat}/K_m$ ) e termodinâmicos da reação ( $\Delta G_{E-T}^{\ddagger}$  e  $\Delta G_{E-S}^{\ddagger}$ ) da protease de *Aspergillus niger* URM 5741.

## MATERIAL E MÉTODOS

### a) Micro-organismo

A linhagem fúngica utilizada foi cedida pela Micoteca URM da Universidade Federal de Pernambuco. Os micro-organismos foram mantidos

em meio Czapek.

### b) Fermentação submersa

Foi utilizado o meio de cultura, MS-2 descrito por Porto et al (1996). A fermentação foi conduzida em Erlenmeyers contendo 50 mL do meio, mantidos a uma temperatura de 30°C e velocidade de 130 rpm em intervalos de tempo de 24, 48 e 72 h. A constituição do meio para 100mL de água destilada foi de: 50 mL de filtrado de soja (4% p/v), NH<sub>4</sub>Cl (0,1% p/v), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,06% p/v), extrato de levedura (0,1% p/v), glicerol (1% p/v), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,435 %p/v) e 1 mL de solução mineral (100mg de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 100mg de MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O; 100mg de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e água destilada q.s.p. 100mL). Os extratos enzimáticos obtidos foram mantidos congelados à -26°C para posteriores determinações analíticas.

### c) Determinações analíticas

A atividade proteásica foi determinada pelo método de Ginther (1979), tendo como substrato a Azocaseína a 1% (p/v). A mistura de reação foi composta de 0,15mL de extrato enzimático e 0,25mL de Azocaseína 1%, incubados por 1 hora a 25°C. Após este período, a reação foi interrompida com adição de 1mL de TCA 10% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 8.000 x g por 20 minutos, e 0,8 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,2mL de NaOH 1,8N. 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 a atividade coagulante do leite (*Milk clotting activity, MCA*) utilizou-se o método de Arima et al. (1968). Como se segue 1,0 mL de solução de leite em pó desnatado (Molico Nestle®) a 12% (p/v) como substrato, contendo 0,01 M de CaCl<sub>2</sub>. A solução foi pré-aquecida durante 10 minutos em banho maria a 37°C seguida da adição de 100µl do extrato enzimático, iniciando o tempo de contagem para o surgimento dos primeiros coágulos de leite. A formação dos coágulos foi observada visualmente ao girar manualmente o tubo de ensaio e o tempo inicial foi determinado quando surgiram as primeiras partículas.

A determinação de uma unidade coagulante do leite por mililitro (U/ml) foi dada pela Equação 1.

$$MCA = 400 \cdot t^{-1}$$

Considerando que a quantidade de enzimas que coagula o leite em 1 minuto é definida por conter 400 unidades, onde  $t$  é o tempo necessário para a formação

dos primeiros grumos de coagulação no leite.

Para a determinação de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976), que utiliza Comassie Brilliant Blue G-250 como corante e albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

d) Determinação dos parâmetros cinéticos

A velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ) e a constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) foram determinadas utilizando o gráfico de Lineweaver-Burk, que se utiliza da Equação 2, plotado a partir das velocidades de reação em diferentes concentrações de substrato ( $2,0 < S_0 < 100,0$  mg/mL) diluídas em tampão Tris-HCl pH 7,2 a 0,2M.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$$

Onde:  $K_m$  – constante de Michaelis-Menten,  $v$  – velocidade da reação,  $V_{max}$  – velocidade máxima da reação e  $[S]$  – concentração de substrato.

A constante catalítica ( $k_{cat}$ ) foi determinada por meio da Equação 3.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]}$$

Onde:  $V_{max}$  é a velocidade máxima da reação e  $[E]$  é a concentração de proteínas expressas em (mg/mL).

2.5. Parâmetros termodinâmicos da reação

Os valores de energia livre de transição e de ligação ao substrato foram determinados através das Equações 4 e 5, respectivamente, reportadas nos trabalhos de Saleem et al. (2005).

$$\Delta G_{E-T}^{\ddagger} = -RT \ln k_{cat}/K_m$$

$$\Delta G_{E-S}^{\ddagger} = -RT \ln K_a$$

Onde:  $R$  é a constante universal dos gases,  $T$  é a temperatura de referência no qual foi realizada o experimento (25°C) e  $K_a = 1/K_m$ .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliou-se o efeito do tempo de fermentação na produção da protease de *A. niger* URM5741, tanto para a atividade proteolítica geral, utilizando azocaseína como substrato, quanto a coagulante do leite. Os resultados obtidos encontram-se dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Avaliação da atividade enzimática em função do tempo de fermentação.

Tempo de fermentação (h)	24	48	72
Atividade proteásica (U/mL)	0,4	1,68	8,37
Atividade coagulante (U/mL)	NC	NC	5,71

NC – Não apresentou coagulação.

Verificou-se que a melhor condição para produção da protease de modo geral se deu em 72 h de fermentação. Radha et al. (2011) em seu estudo envolvendo a produção de proteases ácidas por *Aspergillus* spp. reportaram uma melhor produção em um tempo superior, 120 h, ao obtido no presente estudo.

$$(2)$$

Com relação a enzima coagulante do leite, a melhor condição também foi obtida em 72 h. Cavalcanti et al., (2005) trabalhando com a produção de protease coagulante do leite a partir de *Nocardiosis* sp reportaram uma atividade coagulante de 4,7 U/mL em 56 h de fermentação, resultados são bem semelhantes aos obtidos no presente estudo. A razão entre a atividade coagulante e proteásica obtida foi de 0,68, esse resultado indica que a protease obtida nessas condições de produção não pode substituir a renina de origem animal em processos de coagulação do leite. Todavia essa razão pode ser melhorada pelo estudo de outras variáveis que influenciam o processo de produção.

$$(3)$$

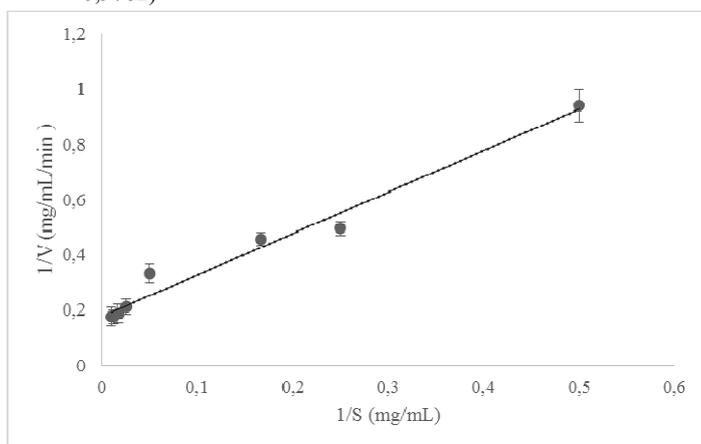
Os parâmetros cinéticos e termodinâmicos da protease extracelular de *A. niger* URM 5741 encontram-se dispostos na Tabela 2. A protease em estudo apresentou valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  de 8,370 mg/mL e 5,596 mg/mL/min respectivamente, estes resultados foram obtidos por meio do gráfico de Lineweaver-Burk (Figura 1).

$$(5)$$

Tabela 2. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos da reação catalisada pela protease de *Aspergillus niger* URM5741.

Parâmetros cinéticos	
$K_m$ (mg/mL)	8,370
$V_{max}$ (mg/mL/min)	5,596
$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	5,419
$k_{cat}/K_m$ (mL/mg.s)	0,647
Parâmetros termodinâmicos da reação	
$\Delta G_{E-T}^{\ddagger}$ (kJ/mol)	1,088
$\Delta G_{E-S}^{\ddagger}$ (kJ/mol)	5,319

Figura 1. Curva duplo recíproco de Lineweaver-Burk para estimação dos parâmetros cinéticos da protease extracelular utilizando azocaseína como substrato ( $R^2 = 0,9762$ )



A constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) está relacionada com a afinidade que a enzima apresenta pelo substrato, quando menor o valor dessa constante maior a afinidade que a enzima apresentará pelo substrato. Mushtaq et al., (2015) em seu estudo cinético da protease purificada de *Rhizopus oryzae* obtiveram um  $K_m$  de 7,0 mg/mL utilizando caseína como substrato. O fato de a protease de *A. niger* URM5741 ter apresentado valores relativamente altos de  $K_m$  e superiores ao reportado pelos autores supracitados, pode ser devido a presença de inibidores no extrato bruto ocorrendo assim efeitos sobre a afinidade da enzima pelo substrato. Sendo recomendada a aplicação posterior de técnicas de purificação visando remover esses interferentes melhorando assim sua afinidade pelo substrato.

O valor do  $K_m$  obtido no presente experimento não inviabiliza a aplicação da protease de *A. niger* em alimentos. O substrato avaliado, azocaseína, é inespecífico, todavia é utilizado nos estudos cinéticos de proteases, uma vez que conferem um indicativo do comportamento geral da enzima com relação ao substrato.

A constante catalítica da reação ( $k_{cat}$ ), ou número de reciclo, consiste no número de moléculas de substrato que uma molécula de enzima consegue converter a produtos por unidade de tempo. Para o referido parâmetro obteve-se  $5,419 \text{ s}^{-1}$  indicando que em um intervalo de 1 segundo uma molécula de enzima pode converter 5,419 moléculas de substrato. Papagianni e Sergelidis (2014) reportaram valores de  $3,2 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$  para a protease de *Penicillium nalgiovense*. A razão  $k_{cat}/K_m$  é um indicador de eficiência catalítica, quanto maior o valor maior a eficiência na catálise do

substrato, a protease estudada apresentou 0,6475 mL/mg.s.

Com relação aos parâmetros termodinâmicos da reação a enzima apresentou valores de 1,088 kJ/mol para a energia livre de transição de estado ( $\Delta G_{E-T}^\ddagger$ ), esse valor energético consiste na energia mínima necessária para a enzima quebrar as ligações do substrato de modo a convertê-lo em produtos. Já para a energia livre de ligação ao substrato ( $\Delta G_{E-S}^\ddagger$ ) obteve-se 5,3195 kJ/mol, para ambos os parâmetros analisados verificou-se que são processos não espontâneos. Saleen et al. (2005) ao estudar as interações termodinâmicas da reação envolvendo a endoglucanase de *Arachniotus citrinus* reportaram valores de -24,1 e 2,9 kJ/mol para as energias livre de transição de estado e ligação ao substrato respectivamente.

## CONCLUSÕES

A protease de *A. niger* URM 5741, apresentou maior produção em um tempo de 72 h de fermentação, sendo verificada também atividade coagulante do leite. Os resultados obtidos no estudo cinético e termodinâmico conferem um indicativo do comportamento da enzima, sendo os resultados obtidos fundamentais para posteriores aplicações, sobretudo na indústria de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FACEPE pelo apoio financeiro concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANANDAN, D.; MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamaris*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 339–347, 2007.
- ARIMA, K.; YU, J.; IWASAKI, S. Milk-Clotting Enzyme from *Mucor pusillus* var. Lindt. **The Acidic Proteases**, v. 546, n. 1967, p. 446–459, 1968.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

**Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Milk-clotting protease production by *Nocardopsis* sp. in an inexpensive medium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 151–154, 2005.

GHOBADI NEJAD, Z. et al. Some investigations on protease enzyme production kinetics using *Bacillus licheniformis* BBRC 100053 and effects of inhibitors on protease activity. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, 2014.

GINTHER, C. L. Sporulation and the- Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. v. 15, n. 4, p. 522–526, 1979.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001–2006, out. 2011.

IANDOLO, D. et al. Enzyme production by solid substrate fermentation of *Pleurotus ostreatus* and *Trametes versicolor* on tomato pomace. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 40–51, jan. 2011.

MIKHAILOVA, R. V. Proteolytic enzymes of mycelial fungi. **Мікробіологія І Біотехнологія**, v. 375, n. 17, p. 47–62, 2011.

MUSHTAQ, Z. et al. Kinetics Study of Extracellular Detergent Stable Alkaline Protease from *Rhizopus oryzae*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. April, p. 175–184, 2015.

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.

PAPAGIANNI, M.; SERGELIDIS, D. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–13, 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**, v. 60, p. 115–122, 1996.

RADHA, S. et al. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. **Scholars Research Library**, v. 3, n. 2, p. 155–163, 2011.

SALEEM, M. et al. Kinetic and thermodynamic properties of an immobilized endoglucanase from *Arachnotus citrinus*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 2, p. 849–855, 2005.