



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**OSMAR SOARES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus* spp E PURIFICAÇÃO EM SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS**

**RECIFE-PE**

**2014**

**OSMAR SOARES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus spp* E PURIFICAÇÃO EM SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito necessário para a obtenção do grau de **MESTRE** em Biociência Animal.

Área de Biotecnologia e Microbiologia Aplicada.

Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto

**RECIFE-PE**

**2014**

**OSMAR SOARES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus spp* E PURIFICAÇÃO EM SISTEMA  
DE DUAS FASES AQUOSAS**

**QUALIFICAÇÃO DE MESTRADO**

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto

Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

(Presidente)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

(Membro Interno)

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa

Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – DMFA

Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

(Membro Interno)

**Data da Aprovação:**

**RECIFE – PE**

**2014**

Aos meus pais, Oscar e Antonia, que com disciplina, humildade, amor e com muito carinho me instruíram a alcançar grandes conquistas e acreditar em minha capacidade. E aos meus irmãos, Austro, Ednaldo, Célia, Jucélia, Selma, Cícera e Daniely pelo apoio e confiança. Vocês foram peças fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional. E a minha querida Esposa Tatiana pelos muitos momentos felizes, pelo amor, pela paciência e pela confiança que cresce a cada dia que conhecemos um ao outro.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Souza Porto pela sua orientação, disponibilidade, respeito, amizade, confiança e proporcionar desafios que me fizeram aprender em tão pouco tempo. Agradeço-a pela credibilidade dada a mim, acreditando sem conhecer as minhas limitações. Agradeço-a pelo estímulo e ensinamentos durante o estágio à docência. Meus sinceros agradecimentos e admiração!

Agradeço a Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Lucia Figueiredo Porto pelo acolhimento em seu Laboratório (LABTECBIO), no qual comecei a desenvolver a minha pesquisa.

À UFRPE através do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal. A FACEPE pela bolsa de estudo concedida que proporcionou a minha dedicação total aos estudos e ao desenvolvimento da pesquisa.

A todos do LABTECBIO, sem vocês a pós-graduação seria sem graça, não é família? À Patyanne e Catarina pela paciência e carinho até hoje, mas principalmente no começo dos trabalhos de bancada. À Amanda por sua generosidade e capacidade de passar as suas informações científicas sem nenhum problema. À Thiago pela solicitude por todos os momentos que precisei nas fases do projeto e por me apresentar o laboratório até antes de ingressar ao mestrado. À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camila Porto e Prof. Dr. Romero por momentos de sugestões e alegrias que me contribuiram para este projeto. E aos amigos que ganhei Juanize, Marcia, Thais, Ellen, Kezia e Daniel e outros como Nadine, Neurisvan, Gesilda, Taciana Ralph e Eulina pelos momentos de muita alegria.

Agradeço a todos do CENLAG, minha outra família. Aos alunos de Iniciação Científica Joyce com sua afinidade com os cálculos, Thalita com a sua paciência, Bruna, Thuany e Thaíris, que no mundo tudo é no diminutivo, Jonatas Lopes pela sua disponibilidade, Rodrigo pelo seu entusiasmo e Matheus com seu bom humor para tudo e solícito, agradeço pela compreensão e dedicação nos dias de muito trabalho. Eu aprendi muito com vocês! Agradeço aos companheiros do laboratório Alana e Ana Carolina pela paciência e disposição sempre que necessário.

Aos meus amigos, Wando, Jefferson e Karina, por ter me acolhido em seus lares e assim permitido que cursasse as disciplinas durante o mestrado.

Aos meus pais Oscar e Antonia que me deram amor e educação, dentre de suas possibilidades, que me incentivaram a traçar o caminho por onde estou, ainda, passando e continuarei. Exemplos sempre lembrados. A eles meus agradecimentos, respeito e amor eterno!

A Tatiana, minha esposa, por ser tão presente e companheira. Por ter me ajudado na resolução de problemas, por ter chorado, sorrído e sonhado comigo, principalmente para um futuro melhor com a nossa família. Agradeço-te imensamente por acreditar e incentivar a busca desse mérito!

Agradeço tudo isso a um ser maior que é onipotente e onisciente, ao meu Deus, Senhor de minha vida, por ter me dado oportunidades no momento certo e me capacitado a cada momento para enfrentar as diversidades que a vida me impõe. Obrigado por sempre estar cuidando de mim, mesmo não entendendo, como Pai zeloso que és! Agradeço pela vida que me concebeste e permitido até esse momento viver debaixo de tua graça.

Obrigado!

*Filho meu, se aceitares as minhas palavras, e esconderes contigo os meus mandamentos, para fazeres o teu ouvido atento à sabedoria; e inclinares o teu coração ao entendimento; Se clamares por conhecimento, e por inteligência alçares a tua voz, se como a prata a buscares e como a tesouros escondidos a procurares, então entenderás o temor do Senhor, e acharás o conhecimento de Deus.*

(Provérbios 2:1-5)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	X
LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS .....	XI
RESUMO .....	XIII
ABSTRACT .....	XIV
1. INTRODUÇÃO .....	15
CAPÍTULO I.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.    Proteases .....	17
2.2.    Obtenção de Proteases microbianas.....	23
2.2.1.    O gênero <i>Aspergillus</i> .....	26
2.3.    Fermentação em Estado Sólido (FES).....	28
2.3.1.    Substratos Agroindustriais .....	31
2.3.2.    Fatores que influenciam a Fermentação em Estado Sólido.....	33
2.3.3.    Umidade e Atividade de Água ( $a_w$ ).....	35
2.3.4.    Transferência de Calor e Temperatura .....	36
2.3.5.    Aeração e Transferência de Oxigênio .....	37
2.3.6.    pH.....	38
2.4.    Aplicação das Proteases na Indústria.....	39
2.5.    Purificação de Proteínas.....	41
2.5.1.    Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa).....	42
2.5.1.1.    Fatores que influenciam no Sistema de Duas Fases Aquosas .....	46
2.5.1.1.1.    Efeitos da carga (pH) .....	46
2.5.1.1.2.    Efeitos do peso molecular da biomolécula .....	47
2.5.1.1.3.    Efeitos da massa molar do polietilenoglicol .....	47
2.5.1.1.4.    Efeitos da adição de sais .....	48
2.5.1.1.5.    Efeitos da temperatura .....	48
2.5.1.1.6.    Efeitos da hidrofobicidade na partição da biomolécula.....	49
2.6.    Caracterização Enzimática.....	50
2.6.1.    Cinética Enzimática.....	50

2.6.2. Termodinâmica Enzimática.....	52
3. OBJETIVOS.....	54
3.1. Objetivo Geral.....	54
3.2. Objetivos Específicos .....	54
REFERÊNCIAS .....	55
CAPÍTULO II.....	73
PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE EXTRACELULAR DE <i>Aspergillus</i> <i>tamarii</i> URM4634 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	73
RESUMO .....	75
1. INTRODUÇÃO .....	76
2. MATERIAIS E MÉTODOS .....	77
2.1. Micro-organismos e inoculação.....	77
2.2. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido.....	77
2.3. Planejamento Fatorial 2 <sup>3</sup> para produção de proteases.....	78
2.4. Determinação da Atividade proteolítica .....	78
2.5. Caracterização do Extrato Bruto.....	79
2.5.1. Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ , $V_{max}$ ).....	79
2.5.2. Efeito do pH e estabilidade na atividade enzimática.....	79
2.5.3. Efeito da temperatura e estabilidade na atividade enzimática.....	79
2.5.4. Efeitos de íons metálicos na atividade proteolítica .....	80
2.5.5. Efeitos de inibidores na atividade proteolítica .....	80
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	81
3.1. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido.....	81
3.2. Parâmetros cinéticos da protease .....	83
3.3. pH ótimo e estabilidade da protease .....	84
3.4. Temperatura ótima e estabilidade da protease .....	85
3.5. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica .....	86
3.6. Efeito de inibidores na atividade proteolítica .....	87
4. CONCLUSÕES.....	88
5. AGRADECIMENTOS.....	88
REFERÊNCIAS .....	89

## LISTA DE FIGURAS

## CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease. (Fonte:< <a href="http://www.google.com/patents/WO1989009819A1?cl=en">http://www.google.com/patents/WO1989009819A1?cl=en</a> >). .....	17
<b>Figura 2.</b> Esquema do mecanismo de ação e ataque nucleofílico da serino protease por hidrólise ao peptídeo. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999). .....	19
<b>Figura 3.</b> Esquema do mecanismo de ação e ataque nucleofílico da cisteíno protease por hidrólise ao peptídeo. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999). .....	20
<b>Figura 4.</b> Esquema do mecanismo de ação da aspártico proteases. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999). .....	21
<b>Figura 5.</b> Esquema do mecanismo de ação da metaloproteases. Adaptado de GRAYCAR, (1999). .....	22
<b>Figura 6.</b> Morfologia representativa de espécie de <i>Aspergillus</i> . (Fonte:< <a href="http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourtc/Lab/Aspergilosis.htm">http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourtc/Lab/Aspergilosis.htm</a> >) .....	27
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática do crescimento de um fungo filamentosos em substratos sólidos. Adaptado de Hölker; Lenz, (2005). .....	31
<b>Figura 8.</b> Fluxograma do processo fermentativo em estado sólido. ....	34
<b>Figura 9.</b> Processos em micro e macroescala envolvidos em um processo de FES. Adaptado de VICCINI; MITCHELL; BOIT, (2001). .....	37
<b>Figura 10.</b> Diagrama de fases para Sistemas de Duas Fases Aquosas, expressas em coordenadas retangulares. Adaptado de COSTA, (2010). .....	44

## CAPÍTULO II

<b>Figura 1.</b> Curva duplo recíproco de Lineweaver-Burke da protease extracelular utilizando azocaseína como substrato ( $R^2 = 0,99$ ). .....	83
<b>Figura 2.</b> Curva de pH ótimo e estabilidade da protease produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 em diferentes tampões por 24 horas de reação. ....	85
<b>Figura 3.</b> Curva de temperatura ótima e estabilidade da protease produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 em diferentes temperaturas por 180 minutos de reação. ....	86

## LISTA DE TABELAS

## CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Espécies de <i>Aspergillus</i> spp produtoras de proteases.....	24
<b>Tabela 2.</b> Proteases obtidas por Fermentação em Estado Sólido a partir de diferentes micro-organismos e substratos.....	32

## CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial completo $2^3$ para Fermentação em Estado Sólido de proteases de <i>Aspergillus tamarisii</i> URM4634.....	78
<b>Tabela 2.</b> Resultados do planejamento fatorial completo $2^3$ para a produção de proteases em Fermentação em Estado Sólido.....	81
<b>Tabela 3.</b> Efeito calculado das respostas do planejamento fatorial completo $2^3$ para a produção de protease de <i>Aspergillus tamarisii</i> URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.....	82
<b>Tabela 4.</b> Efeito de íons de metais na atividade proteolítica.....	87
<b>Tabela 5.</b> Efeito de inibidores na atividade proteolítica.....	88

**LISTA DE ABREVIATURA E SÍMBOLOS**

Asp – Aspartato ou Ácido Aspártico  
 $a_w$  – Atividade de água  
BSA – Albumina de Soro Bovino  
D – Tempo de redução decimal  
DNA – Ácido Desoxirribonucleico  
Ea – Energia de Ativação  
EC – Comissão Internacional de Enzimas  
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético  
FES – Fermentação em Estado Sólido  
FS – Fermentação Submersa  
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana  
K – Coeficiente de partição  
kDA – Quilodaltons  
 $K_m$  – Constante de Michaelis-Menten  
MEROPS - Banco de dados online sobre proteases  
Pc = Ponto Crítico  
PEG – Polietilenoglicol  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
pI – Potencial Isoelétrico  
PMSF - Fluoreto de metilfenilsulfonil  
 $Q_{10}$  – Coeficiente de temperatura  
 $R^2$  = Coeficiente de correlação  
RNA – Ácido Ribonucleico  
RPM – Rotações por minuto  
SDFA – Sistema de Duas Fases Aquosas  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
sp – Espécie dentro do gênero não identificadas  
Sp – Superfície da proteína  
spp – Várias espécies do gênero não identificadas  
THR 1 – Treonina 1  
TL – Tie Line

tPA – Ativador de Plasminogênio Tecidual

URM – Universidade Recife Micoteca

$V_{\max}$  – Velocidade Máxima

$V_p$  – Volume de proteína

$z$  - Fator de sensibilidade do valor  $D$

$\Delta G^\circ$  - Energia livre de Gibbs de inativação ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$\Delta H^\circ$  - Entalpia de inativação enzimática ( $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

$\Delta S^\circ$  - Entropia de inativação enzimática ( $\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ )

## RESUMO

As proteases são as classes de enzimas mais importantes com aplicação biotecnológica, correspondendo cerca de 65% de todas as enzimas comercializadas no mundo. Essas enzimas hidrolisam ligações peptídicas e estão presentes em todas formas de vida. O Brasil possui um grande potencial para esta produção, importando a maior parte dessas enzimas que utiliza. A produção de resíduos e substratos agroindustriais representa um sério problema de disposição final e perda econômica associada ao não aproveitamento deste material, podendo ser minimizada com utilização da tecnologia de Fermentação em Estado Sólido (FES) para obtenção de proteases com aplicações industriais. O presente trabalho teve como objetivo selecionar linhagens de *Aspergillus* spp para a produção de proteases utilizando Fermentação em Estado Sólido, avaliar as variáveis que influenciaram na sua produção e caracterizar bioquimicamente a protease produzida, quanto ao pH ótimo e termoestabilidade. A linhagem selecionada foi *Aspergillus tamaraii* URM4634 por apresentar o melhor desempenho na produção de proteases. Para a produção da enzima foi realizado um planejamento fatorial 2<sup>3</sup>. O melhor resultado foi com atividade proteásica de 401,42 U/mL, em FES com 5g de substrato de Farelo de Trigo e 40% de umidade à 30°C. A temperatura ótima da enzima foi detectada à 40°C, mantendo-se com a sua atividade residual à 90% à 40°C por 180 minutos. O pH ótimo da protease foi 8,0, apresentando 97,24% de estabilidade em pH 8,0. A atividade proteásica apresentou maior inibição pelo íon CuSO<sub>4</sub> (33,98%). A enzima foi inibida pelo PMSF (65,11%), indicando que a enzima é uma Serino Protease. Os valores encontrados para o K<sub>m</sub> e V<sub>máx</sub> foram 18,7 mg/mL e 28,5 mg/mL/min, respectivamente. A Fermentação em Estado Sólido direcionou o desenvolvimento de produção de proteases por *Aspergillus tamaraii* URM4634 em baixo custo, com produção significativa em relação a outras técnicas de fermentação, assim como a enzima exibiu propriedades que fazem dela um potencial para aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus tamaraii*. Proteases. Fermentação em Estado Sólido. Caracterização Bioquímica.

## ABSTRACT

The classes of proteases are the most important enzymes for biotechnological applications, corresponding approximately 65% of all enzymes marketed worldwide. These enzymes hydrolyse peptide bonds and are present in all life forms. Brazil has a great potential for this production, importing most of these enzymes uses. Waste production and agro industrial substrates represents a serious disposal and economic loss associated with non- utilization of this material, which can be minimized with the use of Solid State Fermentation (SSF) technology for obtaining proteases with industrial applications. The present work aimed to select strains of *Aspergillus* spp for protease production using SSF, evaluate the variables that influence its production and biochemically characterize the protease produced, as the pH optimum and thermostability. The selected strain was *Aspergillus tamaritii* URM4634 for having the best performance in the production of proteases. For the production of the enzyme was performed a 2<sup>3</sup> factorial design. The best result was with protease activity of 401.42 U/mL in SSF with 5g substrate wheat bran and 40% moisture at 30°C. The optimum temperature of the enzyme was detected to 40°C, keeping up with the residual activity of 90% at 40°C for 180 minutes. The optimum pH of the protease was 8.0, with 97.24% stability at pH 8.0. Protease activity showed greater inhibition by CuSO<sub>4</sub> ion (33.98%). The enzyme was inhibited by PMSF (65.11%), indicating that the enzyme is a Serine Protease. The values found for the K<sub>m</sub> and V<sub>max</sub> were 18.7mg/mL and 28.5 mg/mL/min, respectively. The SSF directed the development of protease production by *Aspergillus tamaritii* URM4634 in low cost, with significant production in relation to other fermentation techniques, as well as the enzyme exhibited properties that make it a potential for biotechnological applications.

**Keywords:** *Aspergillus tamaritii*. Proteases. Solid State Fermentation. Biochemical Characterization.

## 1. INTRODUÇÃO

A facilidade de obtenção de enzimas tem sido alvo principal da indústria global de como a produção de matéria-prima é uma fonte renovável de energia. Dessa forma, é constatável que a geração de resíduos é próprio a qualquer setor industrial. Devido à conscientização ecológica, iniciada em meados dos anos 70 (ODUM, 2012), ficou claro que a sociedade deverá nas próximas décadas equilibrar o setor produtivo, econômico, ambiental, agregação de valores aos resíduos e subprodutos industriais, principalmente, oriundos da cadeia agroindustrial.

É neste contexto que a utilização de sólidos ou líquidos agroindustriais como base de produção de enzimas microbianas de baixo custo tem recebido cada vez mais atenção do setor biotecnológico (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). De uma forma particular, a bioconversão dos subprodutos e resíduos da indústria agrária representam, hoje, um recurso possível para a síntese de biomoléculas úteis. Entre as enzimas microbianas produzidas, estão as proteases.

As proteases, ou enzimas proteolíticas, representam o grupo de enzimas mais comercializadas no mundo, representando cerca de 60% (UPADHYAY et al., 2010; DHANDAPANI et al., 2012; KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012; SANKEERTHANA; PINJAR; JAMBAGI, 2013;) a 65% do mercado mundial de enzimas (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010). Elas são conhecidas pela capacidade de hidrolisar ligações peptídicas e estão presentes em todos os organismos (ROSSO et al., 2012). Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias se torna evidente a partir da sua ocorrência em todos os organismos vivos, sendo que as proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para consequentemente a absorção da célula, enquanto as intracelulares possuem um papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998)

Diante desse mercado de enzimas, o Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza, o país possui um grande potencial para esta produção, devido a abundância de matéria orgânica que pode ser utilizada como substrato e no processamento de biomoléculas pelo método de fermentação. Por outro lado, a diversidade biológica, ainda, é pouco explorada para descobertas de novos micro-organismos produtores de enzimas de interesse industrial (ORLANDELLI et al., 2012).

Entre a diversidade de organismos, os micro-organismos são as fontes preferidas para a produção de proteases, devido a sua diversidade bioquímica e a susceptibilidade à manipulação genética (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; ROSSO et al., 2012). Micro-organismos

tais como bactérias, actinomicetos, leveduras e fungos são conhecidos por produzirem as enzimas proteolíticas de interesse industrial (KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012; RADHA et al., 2011). A aplicação de proteases para a produção de biomoléculas bioativas tem recebido grande atenção como uma alternativa viável para a abordagem biotecnológica.

Os fungos filamentosos, como o *Aspergillus*, são explorados para a produção de proteases devido a sua habilidade de colonizar os substratos e produzir uma ampla faixa de enzimas extracelulares (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010). Contudo, os *Aspergillus* spp crescem em meios de baixo custo (subprodutos sólidos agroindustriais) e secretam grandes quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011), o que representa uma vantagem no processo de substratos ou resíduos proteicos da biomassa bem como a procura de novas espécies com potencial biotecnológico.

A utilização de tecnologias alternativas nos processos fermentativos, como a Fermentação em Estado Sólido (FES) e a Fermentação Submersa (FS), envolvendo *Aspergillus* spp é amplamente estudado, devido aos seus potenciais na produção de proteases para as diversas indústrias, desde agrária à fármaco-química.

A aplicação de proteases requer um grau de purificação, para que a mesma seja aplicada à indústria, ao mesmo tempo não necessite de equipamentos sofisticados para a purificação. Então, o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) possui diversas vantagens em separação e purificação. Estas vantagens incluem a biocompatibilidade, devido ao alto teor de água em cada fase do sistema, baixo tempo de processo, baixa tensão interfacial e consumo de energia (HERCULANO et al., 2011; PORTO et al., 2011), sendo uma técnica promissora a nível de purificação, custo-benefício em relação a outros métodos de purificação (PORTO et al., 2011).

O setor da Biotecnologia é considerado uma das áreas mais promissoras na indústria enzimática. Enzimas proteolíticas são consideradas agentes propícios nos processos industriais, ressaltando as áreas de maior uso e demanda, como as indústrias de detergentes, farmacêuticas e de alimentos (HAJJI et al., 2010). Tendo em vista que a produção e purificação de enzimas em processos industriais são de alto custo, este trabalho busca encontrar novos micro-organismos produtores de proteases com maior produtividade e atividade específica para aplicação em processos industriais, aliando-se a um processo baixo custo e conseqüentemente possibilitando a diminuição de etapas de produção de purificação da enzima.

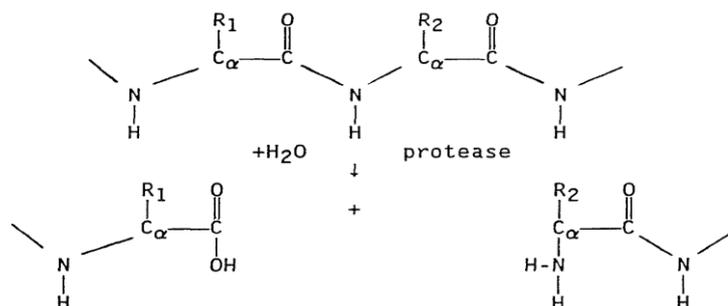
## CAPÍTULO I

### 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1. Proteases

As proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas em uma molécula de proteína (SANDHYA et al., 2005), bem como um grupo complexo de enzimas que diferem em sua especificidade ao substrato, mecanismo catalítico e sítio alvo (VISHWANATHA; APPURAO; SINGH, 2009). Elas representam os maiores grupos de enzimas industriais com crescente exigência de mercado, devido as suas aplicações na indústria biotecnológica (SANDHYA et al., 2005). Tais enzimas são constituintes essenciais de todas as formas de vida na Terra, incluindo procariontes (bactérias) e eucariontes (fungos, plantas e animais) (RAJMALWAR; DABHOLKAR, 2009; KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012).

As proteases são classificadas de acordo com o tipo catalítico, sendo esta que determina o pH ótimo em que as peptidases clivam a ligação peptídica; os tipos de proteases de acordo com o pH são: ácidas, neutras e alcalinas (IQBAL; AHMED; KHAN, 2011; RADHA et al., 2011; RAWLINGS, 2013). Na proteólise de uma ligação peptídica, uma molécula de água reage com o grupo carbonila peptídico e a ligação do grupo amina do aminoácido seguinte é rompida, conforme mostra a Figura 1:



**Figura 1.** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease. (Fonte: < <http://www.google.com/patents/WO1989009819A1?cl=en>>)

As enzimas proteolíticas estão intrinsecamente envolvidas em muitos processos fisiológicos, incluindo a digestão de proteínas alimentares, a reciclagem de proteínas intracelulares, na coagulação sanguínea, apresentação de antígenos bem como ativação de

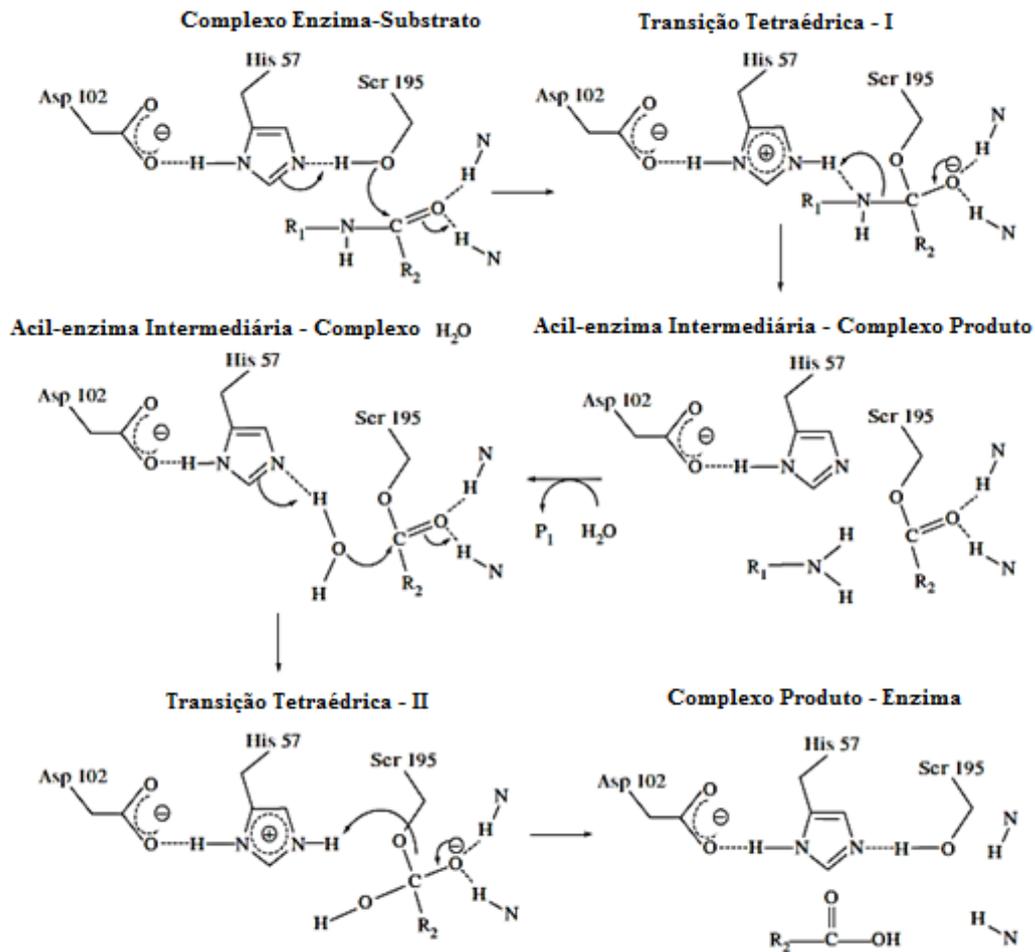
proteínas, incluindo enzimas, hormônios peptídicos e neurotransmissores (MORYA et al., 2012; UPADHYAY et al., 2010) até à iniciação da morte celular (YIKE, 2011).

As proteases são aplicadas em diversos processamentos industriais. A maior aplicação dessas enzimas ocorrem na indústria de detergentes (AHMED; ZIA; IQBAL, 2011; HAJJI et al., 2010), alimentos (SHIEH; PHAN THI; SHIH, 2009), farmacêutico (CRAIK; PAGE; MADISON, 2011), processamento de resíduos de proteínas e síntese de peptídeos (CHAUHAN; GUPTA, 2004; RAJMALWAR; DABHOLKAR, 2009; SHIKHA; SHARAN; DARMWAL, 2007). As proteases podem ser classificadas em diferentes grupos e subgrupos tendo como características importantes o seu sítio alvo e o mecanismo de ação. De acordo com a base de dados MEROPS são reconhecidas sete grupos de proteases: cisteíno protease, treonino protease, serino protease, metaloprotease, aspártico protease e proteases desconhecidas (MOFFITT; MARTIN; WALKER, 2010; RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2010; RAWLINGS, 2013).

Tipicamente, treonino protease e metaloprotease tem uma faixa de pH neutro; Aspártico protease e cisteíno protease possuem pH ótimo ácido, quanto a serino protease, a faixa de pH ótimo é do neutro ao básico. No entanto existem exceções como Meprin B, uma metaloprotease com um pH ótimo ácido; renina e retropepsina de HIV-1 são aspártico protease com um pH ótimo neutro, bem como a calpaína e as caspases são cisteíno protease com um pH ótimo neutro (RAWLINGS, 2013).

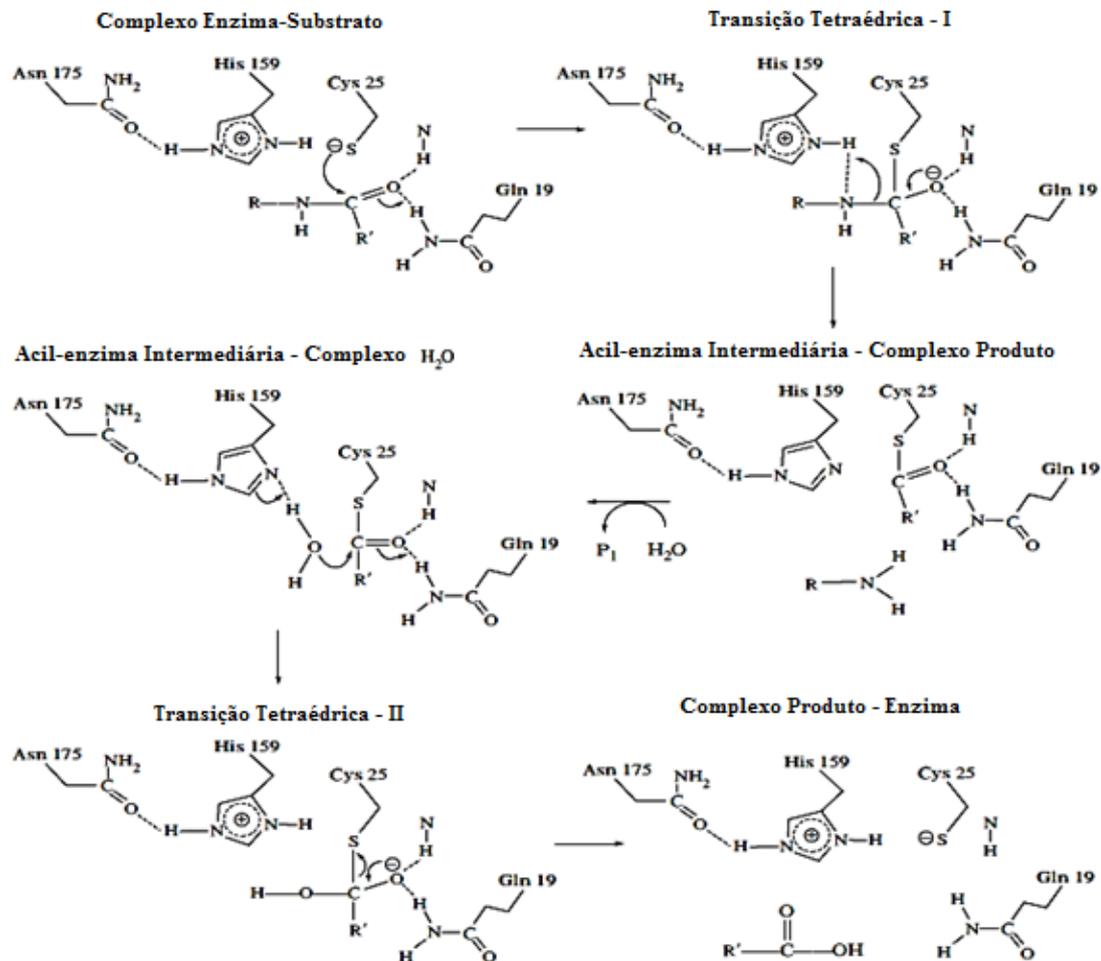
As serino proteases (EC 3.4.21) são o maior e o grupo de proteases mais estudadas, existem mais de um terço de proteases conhecidas pertencentes a este grupo. Elas hidrolisam as ligações peptídicas através de um resíduo de serina nucleofílica no sítio ativo (PAGE; DI CERA, 2008). Entre as serino proteases estão as enzimas digestivas, tais como tripsina e quimotripsina (YIKE, 2011). Um esquema do mecanismo de ação de uma serina proteases está apresentado na Figura 2.

No mecanismo de reação dessa serino protease ocorre a formação de ligação covalente da enzima ao grupo acila (R-CO-), para formar intermediário tetraédrico, onde envolve o ataque nucleofílico na serina 195 ao átomo do carbono da carbonila da ligação peptídica. Nessa reação é formada uma ponte de hidrogênio, no processo de estabilização tetraédrica, entre o átomo de oxigênio carregado negativamente da carbonila e o grupo NH, acarretando a transferência de prótons da histidina 57 para o grupo amino cindível, ou seja, separável. A desacilação ocorre nesse mesmo estágio. Desta vez uma molécula de água é que participa da hidrólise, ao invés do ataque nucleofílico da serina 195 (GRAYCAR, 1999; RAWLINGS, 2013).



**Figura 2.** Esquema do mecanismo de ação e ataque nucleofílico da serino protease por hidrólise ao peptídeo. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999).

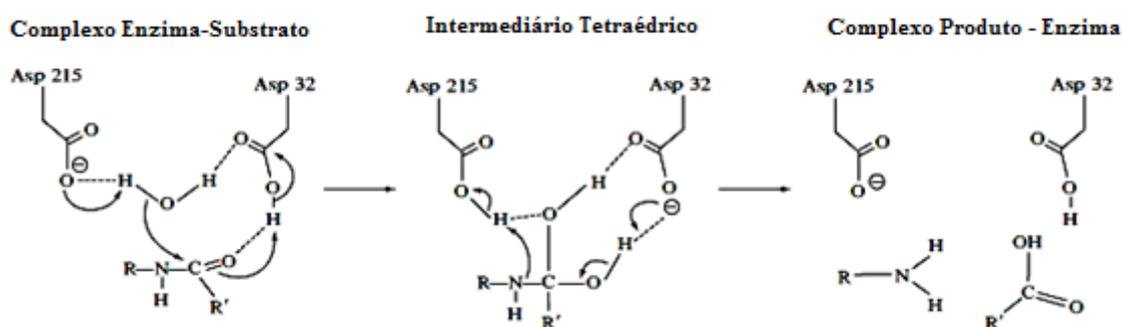
As cisteíno proteases (EC 3.4.22) é uma família que contém endo e exopeptidases, como papaína, calpaína e caspases como as representantes mais conhecidas (YIKE, 2011). Além de Bleomicina hidrolase produzida a partir de *Saccharomyces cerevisiae* (XU; JOHNSTON, 1994) e um homólogo de calpaína a partir de *Aspergillus nidulans* estão entre os exemplos de cisteíno peptidases fúngicas (FUTAI et al., 2001). Um esquema do mecanismo de ação de uma cisteíno protease está apresentado na Figura 3.



**Figura 3.** Esquema do mecanismo de ação e ataque nucleofílico da cisteína protease por hidrólise ao peptídeo. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999).

Na reação ocorre um ataque da cisteína 25 ao carbono da carbonila peptídica da ligação ao substrato cindível, ou seja, onde ocorrerá a divisão peptídica, para formar o intermediário tetraédrico pela rotação do anel do imidazol ligado a histidina 159. A hidrólise do acil-enzima, no intermediário, desacula devido a transferência do próton da molécula de água para histidina 159, gerando o nucleófilo hidroxila (OH) ( GRAYCAR, 1999; RAWLINGS, 2013).

Aspártico proteases (EC 3.4.24) contém dois resíduos de ácido aspártico que ativam a molécula de água, que medeiam o ataque nucleofílico sobre a ligação peptídica. A maioria delas estão ativas em pH baixo (< 5,0) (YIKE, 2011), com exceção da renina pH 5,5 a 7,0 (GRAYCAR, 1999). Os representantes mais conhecidos das aspártico proteases são pepsina e catepsina D (YIKE, 2011). O esquema do mecanismo de ação de uma aspártico proteases está ilustrado na Figura 4.



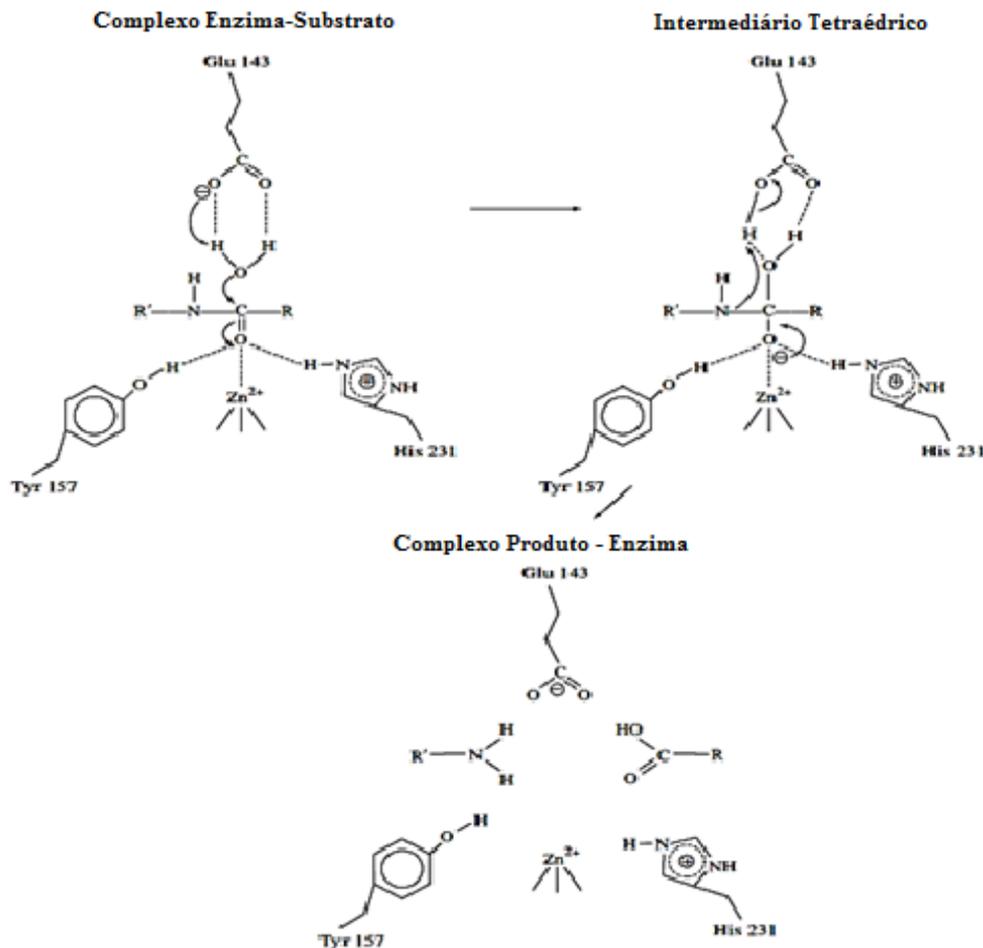
**Figura 4.** Esquema do mecanismo de ação da aspártico proteases. Fonte: Adaptado de GRAYCAR (1999).

Na reação, ocorre ataque nucleofílico da molécula de água ativada pela enzima Asp 215 e Asp 32 sobre o átomo de carbono da carbonila da ligação peptídica suscetível para formar o intermediário tetraédrico, formando produtos por uma catálise básica geral pelo Asp 215 e por uma catálise ácida geral pelo Asp 32 (GRAYCAR, 1999;RAWLINGS, 2013).

Metaloproteases (EC 3.4.24) contêm muitas famílias com aminopeptidases de origem humana que tem um íon de zinco no sítio ativo catalítico ligados por duas histidinas e um glutamato no centro ativo (RAWLINGS, 1995). A família fungalisina é representada por endopeptidases de *Aspergillus flavus* capazes de hidrolisar a laminina, elastina e colágeno. A família deuterolisina contém metaloproteases fúngicas com duas histidinas de ligação de zinco e um catalisador de glutamato (MARKARYAN et al., 1994;CHANG; WERB, 2001). Esquema do mecanismo de ação de uma metaloproteases está ilustrada na Figura 5. A ligação do substrato aos sítios ativos com o oxigênio da carbonila da ligação peptídica polarizada positivamente com íon de zinco, desloca o próton da água (nucleofílica) em direção ao glutamato 143, formando o intermediário tetraédrico. O glutamato 143 está presente em todas as etapas da reação (GRAYCAR, 1999; RAWLINGS, 2013).

Treonina proteases (EC 3.4.25) foram descritas pela primeira vez em 1995, sendo classificadas como hidrolases nucleófilas N-terminal (SEEMÜLLER et al., 1995; LI et al., 2012). A atividade enzimática é fornecida por uma tríade catalítica consistindo de treonina, lisina e ácido glutâmico, sendo que o grupo hidroxila de funções THR1 é o nucleófilo reativo de hidrólise de peptídeos. O exemplo mais bem descrito e documentado de proteases treonina é o proteassoma endopeptidase, responsável pela degradação de proteínas na célula eucariótica. Resultados de hidrólise de proteínas para a produção predominante de oligopeptídeos, de cerca

de nove aminoácidos, que estão sujeitos à proteólise dentro da célula (MOFFITT; MARTIN; WALKER, 2010)



**Figura 5.** Esquema do mecanismo de ação da metaloproteases. Adaptado de GRAYCAR, (1999).

Embora estas sejam as proteases mais conhecidas, outras com diferentes características catalíticas, tais como treonina proteases e outras proteases desconhecidas estão tendo o seu centro catalítico investigado. Estudos recentes mostram que a protease treonina, recém-descoberta, tem seqüências de aminoácidos e estruturas enzimáticas semelhantes com muitas serino proteases (LI et al., 2012). Por conseguinte, as proteases desconhecidas (E.C. 3.4.99), assim denominadas devido ao tipo catalítico não ser conhecido, com os avanços de pesquisas nos mecanismos de ação, mostram que essas proteases estão sendo reclassificadas para grupos como serino proteases, aspártico proteases, metaloproteases e treonina proteases (RAWLINGS; BARRETT; BATEMAN, 2010).

## 2.2.Obtenção de Proteases microbianas

A procura de enzimas, particularmente, as de origens microbianas, é crescente devido as suas aplicações em uma ampla variedade de processos (PADMAPRIYA et al., 2012). Os micro-organismos representam uma fonte atraente de proteases uma vez que podem ser cultivadas em grandes quantidades num curto período de tempo, relativamente, por meio de métodos de fermentação estabelecidos, e produzem uma abundante oferta e regular de produto desejado (GUPTA et al., 2002).

Atualmente, outras fontes de obtenção de proteases têm sido estudadas e isoladas a partir de extratos de insetos para vacinas de imunoterapias (GRIER et al., 2012), venenos de cobras (*Bothrops alternatus* e *B. moojeni*), por atribuir presença de enzimas proteolíticas como serino proteases, estruturalmente semelhantes a trombina e possuir atividades fibrinolíticas (FERNANDES-DE-OLIVEIRA et al., 2013), no tomate, para fins de estudo na interação patógeno-hospedeiro (HÖRGER; VAN DER HOORN, 2013), húmus de minhoca, reconhecido pelos produtores agrícolas por melhorar o equilíbrio biológico do solo (SHARMA et al., 2005) e nos fitoplânctons protistas, como produtores de metacaspases com funcionalidade na morte celular, sendo um mecanismo que resulta na diversidade evolutiva das proteases (CHOI; BERGES, 2013).

Diante dessa diversidade, muitas dessas proteases têm sido obtidas a partir de diferentes micro-organismos, incluindo o domínio Bactéria como o gênero *Bacillus* e Actinomicetos (JAIN; AGRAWAL; JAIN, 2013), destacando-se com o gênero *Streptomyces*; Archeobactéria como a bactéria hipertermófila *Pyrococcus* sp, revelando inibidores alostéricos na atividade catalítica das proteases (ZHAN et al., 2014); e Eukaria com os fungos do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus* sendo dos fungos filamentosos mais utilizados em processos biotecnológicos (GRIMM et al., 2005; OYELEKE; EGWIM; AUTA, 2010).

Espécies de *Aspergillus* spp asseguram um enorme potencial para a produção de enzimas, obtendo níveis de atividades enzimáticas superiores aos fungos geralmente considerados como os melhores produtores de proteases (IANDOLO et al., 2011). As espécies de *Aspergillus* spp que se destacam na produção de proteases estão relacionadas na Tabela 1 de acordo com o tipo de proteases produzidas.

**Tabela 1.** Espécies de *Aspergillus* spp produtoras de proteases.

Micro-organismo	Tipo de proteases	Tipo catalítico	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	Protease ácida	Aspártico proteases	LI et al. (2014)
<i>Aspergillus orizae</i>	Protease ácida	-	KARTHIC et al.(2014)
<i>Aspergillus orizae</i> HN3042	Protease ácida	Aspártico proteases	XU et al., (2013)
<i>A. niger</i> CICC2377	Protease ácida	Aspártico proteases	XU et al., (2013a)
<i>Aspergillus orizae</i> LK-101	Protease ácida	Serino proteases	LEE et al., (2010)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Protease ácida	Cisteíno proteases	IRE; OKOLO; MONEKE, (2011)
<i>Aspergillus orizae</i> KSK-3	Protease ácida	Serino proteases	SHIRASAKA et al., (2012)
<i>Aspergillus niger</i> I1	Protease ácida	Aspártico proteases	SIALA et al., (2009)
<i>Aspergillus funiculosus</i>	Protease ácida	-	SHAHINA; HOSSAIN; HAKIM, (2013)
<i>Aspergillus awamorii</i>	Protease ácida	-	NEGI; BANERJEE, (2010)
<i>A. orizae</i> MTCC5341	Protease ácida	Aspártico proteases	VISHWANATHA; APPURAO; SINGH, (2009)
<i>Aspergillus sojae</i>	Protease neutra	-	SILVESTRE et al., (2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	Protease neutra	Metaloproteases	SANKEERTHANA; PINJAR; JAMBAGI, (2013)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Protease neutra	Serino proteases	ANITHA; PALANIVELU, (2013)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	Protease neutra	-	SHAHINA; HOSSAIN; HAKIM, (2013a)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Protease neutra	Serino proteases	HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., (2011)
<i>Aspergillus flavus</i>	Protease alcalina	Serino proteases	KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, (2012)
<i>Aspergillus flavus</i>	Protease alcalina	Serino proteases	YADAV; BISHT; DARMWAL, (2011)
<i>Aspergillus tamaritii</i>	Protease alcalina	Serino proteases	ANANDAN; MARMER; DUDLEY, (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Protease alcalina	Metaloproteases	SANKEERTHANA; PINJAR; JAMBAGI, (2013a)
<i>Aspergillus clavatus</i> ES1	Protease alcalina	-	HAJJI et al., (2008)
<i>A. terreus</i> (IJIRA6.2)	Protease alcalina	Serino proteases	CHAKRABARTI; MATS UMURA; RANU, (2000)
<i>A. nidulans</i> HA-10	Protease alcalina	Serino proteases	CHARLES et al., (2008)
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Protease alcalina	Serino proteases	TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, (2003)
<i>Aspergillus niger</i> C-15	Protease alcalina	Metaloproteases	JEONG-DONG KIM, (2004)
<i>Aspergillus versicolor</i>	Protease alcalina	-	CHOUDHARY; JAIN, (2012)

As espécies de *Aspergillus* spp estudadas envolveram processos de Fermentação em Estado Sólido e Fermentação Submersa, devido ao seu potencial em produzir proteases. Com

o avanço da biotecnologia, principalmente na área de engenharia enzimática aplicada, abriu uma nova era de aplicações de enzimas a partir de micro-organismos em muitos processos industriais, resultando, não apenas, no desenvolvimento de uma série de produtos, mas na melhoria no processo de produção e desempenho de várias técnicas já existentes (BINOD; PALKHIWALA, 2013).

A produção de proteases é uma capacidade inerente a todos os micro-organismos, assim somente aqueles que produzem em grandes quantidades de enzimas extracelulares são os que possuem importância industrial. No entanto, muitas proteases aplicadas a fins industriais enfrentam algumas limitações, sendo que cerca de 30 – 40% da produção de custo das enzimas industriais estão relacionados ao meio de crescimento (JOO; CHANG, 2005).

As proteases produzidas por micro-organismo são altamente influenciadas pelos componentes ou parâmetros do meio de cultivo. A avaliação de carbono, nitrogênio e íons metálicos bivalentes tanto em nível de substrato quanto de custo podem aumentar a produtividade enzimática. Entre outros fatores que são importantes estão a aeração, densidade do inóculo, pH, temperaturas e o tempo de incubação também afetam a produção de proteases (BEG; SAHAI; GUPTA, 2003).

Paranthaman; Alagusundaram; Indhumathi (2009) realizaram um estudo comparativo de proteases utilizando diferentes variedades de arroz em Fermentação em Estado Sólido (FES) por *Aspergillus niger*. No intuito de agregar valor aos resíduos da indústria com a produção de proteases para ser usados na indústria de detergentes e de couro. Entre as variedades testadas pelos autores os substratos produziram atividades máximas de 67,7 U/g, em condições de FES.

No trabalho de Sankeerthana; Pinjar; Jambagi (2013) *Aspergillus niger* e *Aspergillus flavus* foram utilizados para a produção de proteases por FES variando as condições fisiológicas de farelo de arroz como temperatura de 27 – 75°C; ajuste de pH na faixa de 6,0 – 10,0 usado na fermentação NaOH e HCl 1N; período de incubação 24 – 120h. Nesse estudo, concluíram que os resíduos de arroz como um substrato barato pode ser utilizado para a produção de proteases a partir do *A. niger* (66,0 U/mL) e *A. flavus* (55,0 U/mL), quando em temperaturas de 37°C, pois em altas temperatura cessou o crescimento microbiano. Assim o estudo adianta que *A. niger* para a produção proteásica é bastante elevada após a purificação parcial e portanto pode ser explorado com sucesso na indústria de detergentes, pois apresentou atividades de 24,75 U/mL em pH 9,0 e 22,0 U/mL para *A. flavus* em pH 7,0.

Portanto, é de grande importância procurar ou desenvolver alternativas de produção economicamente viáveis como os resíduos agroindustriais. E o interessante é notar que estes substratos e resíduos podem doravante render uma pesquisa de custo-benefício para o

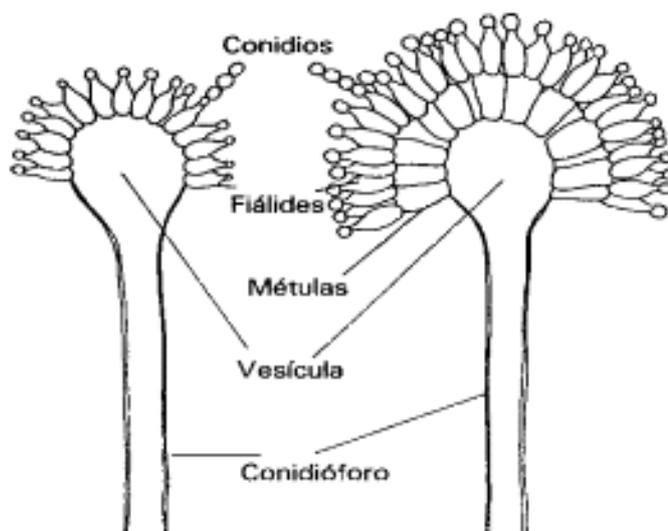
fornecimento de matéria-prima. Assim, as proteases microbianas são úteis em várias áreas de aplicação, sendo considerada uma ferramenta para pesquisa e desenvolvimento da ciência.

### 2.2.1. O gênero *Aspergillus*

*Aspergillus* foi catalogado pela primeira vez pelo biólogo italiano, Pietro Micheli em 1729. O nome *Aspergillus* foi dado devido a sua forma quando observado ao microscópio, parecendo-se com um *aspergillum* (aspersório – um borrifador de água benta) e nomeou o gênero de acordo com o objeto. Dentre os fungos filamentosos não há um gênero mais adequado para ser estudado, além de compor uma ampla distribuição mundial estando presente na superfície, no ar, na água, tanto em organismos vegetais como em animais. Os *Aspergillus* estão associados a deterioração da matéria orgânica, bem como muitas espécies são utilizadas para a produção de enzimas, na biossíntese química e na transformação de compostos. Entretanto, há espécies de *Aspergillus* que são patogênicas para o homem, para os animais, plantas e existem aquelas que durante seu metabolismo produzem toxinas (GIBBONS; ROKAS, 2013). Os *Aspergillus* são capazes de produzir em condições naturais e laboratoriais, metabólitos secundários tóxicos como aflotoxinas B1, B2, G1 e G2, Ocratoxina A e Ácido Ciclopiazônico. Esses metabólitos são denominados de micotoxinas (GONÇALEZ et al., 2013).

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem à Família das Trichomaceae, Ordem Eurotiales, à Classe Eurotiomycetes e ao Filo Ascomycota. Existem mais de 200 espécies dentro deste gênero, mas apenas cerca de 20 têm sido encontradas como causas de doenças em organismos (HUBKA et al., 2013). As colônias desses micro-organismos, geralmente têm crescimento rápido e densamente distribuídos nos substratos, inicialmente apresentam-se com colorações esbranquiçadas, amareladas, passando para o marrom, o esverdeado ou para o negro. As colônias são compostas por micélios aéreos com conidióforos eretos sobre a superfície do meio (BENNETT, 2010; HUBKA et al., 2013).

As estruturas morfológicas são características para a sua classificação. A estrutura aspergillar ou aspergillum, consiste de uma haste asseptada que termina em uma vesícula, na qual nascem as estruturas reprodutivas, denominadas células conidiogênicas (fiálides e métulas). As fiálides produzem os conídeos com diferentes pigmentações e ornamentações. Quanto as métulas são estruturas estéreis que geram as fiálides. Ademais, quando a “cabeça aspergillar” apresenta métulas denomina-se bisseriado, quando não, unisseriado. A anatomia da estrutura reprodutiva de um *Aspergillus* está representada na Figura 6.



**Figura 6.** Morfologia representativa de espécie de *Aspergillus*. (Fonte:<  
<http://www.uprm.edu/biology/profs/betancourt/Lab/Aspergilosis.htm>>)

Existem uma inter-relação mutualística, predatória, patogênicos e competitivos entre os *Aspergillus* e o ambiente. Isso tem produzido um nível elevado da diversidade fúngica. Para driblar os diversos desafios ecológicos, Kempken; Rohlfs (2010) argumentaram que seleção natural no Reino Fungi favoreceu a formação de metabolitos secundários e um maquinário regular de biossíntese, através do ambiente antagônico. Os autores afirmaram ainda que o ambiente foi o agente crucial para evolução dos fungos e subsequentes a produção de metabolitos secundários.

Os metabolitos secundários fúngicos são separados em quatro grupos: alcaloides, peptídeos não-ribossomais, policetídeos e terpenos (ROHLFS et al., 2007). O gênero *Aspergillus* são exemplos de adaptação ao ambiente bem como na biossíntese de metabolitos secundários e regulação. As linhagens de *Aspergillus tamarii*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, os conjuntos de metabolitos secundários tem sido bem caracterizado a nível genético bem como a produção de micotoxinas como a aflatoxina, tendo, através desses estudos, a descoberta de seu precursor, esterigmatocistina (KEMPKEN; ROHLFS, 2010).

Um estresse causado no ambiente que mude as condições ótimas para crescimento e desenvolvimento dos fungos pode afetar a dinâmica populacional do micro-organismo, conseqüentemente fornecendo uma limitação ou seletividade na síntese de metabolitos, uma

vez que as enzimas microbianas são de interesse industrial biotecnológico (ROHLFS et al., 2007).

### 2.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)

Fermentação em Estado Sólido (FES) é definida como a fermentação envolvendo substratos sólidos na ausência (ou quase ausência) de água livre; no entanto, o substrato deve possuir umidade suficiente para apoiar o crescimento e metabolismo de micro-organismo. FES estimula o crescimento de micro-organismos na natureza, em substratos úmidos e foi creditado como a técnica responsável para o início da fermentação em tempos antigos. Quase todo o processo de fermentação utilizado nos tempos antigos eram baseados nos princípios de FES (PANDEY, 2003). Sendo uma técnica antiga no oriente, datada aproximadamente de 2.600 a.C. (RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005), a FES oferece inúmeras oportunidades no processamento de substratos agroindustriais.

A partir de 1940, houve um grande desenvolvimento da fermentação a nível industrial. Sendo adaptada a tecnologia de Fermentação Submersa (FS). A FS foi aplicada para produzir a penicilina e o crescimento da importância deste antibiótico durante a Segunda Guerra Mundial, a FS se tornou uma tecnologia de modelo para a produção de qualquer composto por fermentação. Assim, os processos de FES foram praticamente negligenciados. Entretanto, entre 1960-1970 a descoberta de micotoxinas, produzidas por fungos em FES, fez ressurgir o interesse neste tipo de processo (PANDEY, 2003; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). A partir de 1980, alimentação para animais enriquecidas com fontes de proteínas e vários outros produtos como álcool e ácido giberélico tem sido desenvolvido por processos de FES. Pandey; Soccol; Mitchell, (2000), desenvolveram novas técnicas de Biorremediação e Degradação de compostos tóxicos por FES, obtendo ótimos resultados. Subsequente, com a produção de tanases com novos resíduos agroindustriais, utilizando o fungo *Aspergillus niger* ATCC16620 por FES (SABU et al., 2005).

Martins et al., (2011), apresentaram compostos bioativos e bioprocessos de conversão de resíduos agroindustriais por FES em produção e extração de compostos fenólicos de fontes naturais, sendo divididos em dois grupos: ácidos hidroxibenzoicos e os ácidos hidroxicinâmicos. Os autores concluíram que a FES é uma tecnologia limpa, com grande potencial de aplicação na produção ou extração de compostos biologicamente ativos de fontes naturais, tal como os resíduos agroindustriais reutilizados nesta área é de grande interesse

devido à sua disponibilidade, baixo custo e características que permitem obtenção de diferentes compostos fenólicos, além de ser uma alternativa favorável ao meio ambiente para a sua eliminação.

Como visto a fermentação tem sido amplamente utilizada para a produção de uma grande variedade de substâncias que são altamente benéficas para os indivíduos e as indústrias. Ao longo dos anos, as técnicas de fermentação ganharam grande importância devido à sua situação econômica e vantagens ambientais. Técnicas antigas foram mais modificadas e aperfeiçoadas para maximizar a produtividade. Isto envolveu o desenvolvimento de novas máquinas e processos. As descobertas de vários metabólitos secundários produzidos por micro-organismos (compostos bioativos) resultou na exploração de processos fermentativos como resultado de uma técnica de produção para estes compostos (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012). Ao nível de estudo, tanto FES e FS tem sido estudada; no entanto, algumas técnicas obtiveram melhores resultados do que outros. Muitas pesquisas ainda precisam ser feitas para identificar a melhor técnica de fermentação para cada composto e/ou processos.

Com base em pesquisas, certos compostos bioativos têm encontrado a FES como técnica de produção, enquanto que outros compostos foram extraídos utilizando FS. A fermentação foi classificada em FES e FS baseado principalmente na quantidade de água utilizado durante a fermentação. Subramaniyam; Vimala, (2012), descreveram que a diferença entre os dois bioprocessos refere-se à utilização, na FES, do substrato sólido úmido, rico em nutrientes e podendo ser utilizados por períodos longos de fermentação, o qual, o substrato, insolúvel em água e não se encontra suspenso no líquido, esta técnica suporta a liberação controlada de nutrientes ao contrário da FS, em que se utilizam substratos sólidos dissolvidos ou submersos no líquido, no qual os compostos bioativos são secretados para o caldo de fermentação; quanto aos substratos, sendo, utilizados muito rapidamente. Portanto, precisam ser suplementados com nutrientes e em alguns casos ser substituídos.

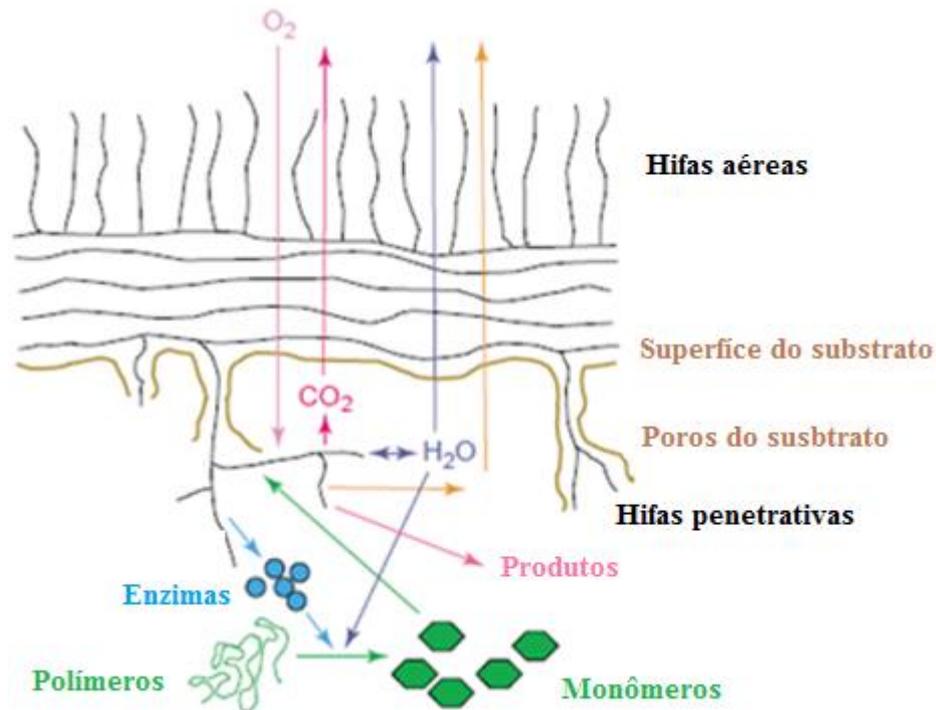
Para Couto; Sanromán, (2006), encontram fatores que limitam o desenvolvimento do bioprocessos em FES em larga escala como controle de parâmetros de pH, temperatura, arejamento, transferência de oxigênio e umidade. Corroborando com os mecanismos sofisticados que são normalmente associados a FS que possui controle dos parâmetros já mencionados anteriormente. Por outro lado, os autores ressaltam as vantagens da FES em relação à FS como uma técnica mais simples e de menor custo, além de alta produtividade, mais circulação de oxigênio, menos processos no upstream, tecnologia simples e um dos mais importantes que se assemelha com a habitat natural de vários micro-organismos.

Zanphorlin et al., (2010), utilizaram o fungo *Myceliophthora* sp em dois bioprocessos fermentativos: FES e FS, caracterizando as proteases em seguida. Obtendo em FES (1,78 U/mL) resultados 4,5 vezes maior do que em FS (0,38 U/mL). Concluindo que a FES foi efetiva na produção de proteases, utilizando o farelo de trigo como substrato.

Pandey et al., (2002) acreditam que a tecnologia FES não deve ser encarada como um bioprocessos que substitui a FS. Na verdade, cada uma dessas técnicas possui suas potencialidades e particularidades. Portanto, existe o consenso de estudo e/ou investigação contínua dos fatores relacionados a FES para permitir que o pleno potencial desta tecnologia seja utilizada cada vez mais.

Na FES as enzimas são produzidas pelos fungos diretamente sobre substrato insolúvel em água. Para que isso ocorra é necessário que após a esporulação as hifas desenvolvam como um tapete de micélio se espalhando por todo o meio. Enquanto algumas hifas aéreas se sobressaem outras penetram no substrato por crescimento em espaços entre os grãos dos sólidos padronizados. As atividades metabólicas ocorrem principalmente perto da superfície do substrato e no interior dos poros; no entanto, regiões expostas do micélio mostram também o metabolismo e podem haver um transporte de substâncias a partir da penetração de hifas aéreas. Enzimas hidrolíticas, que são produzidas pelo micélio, difundem para a matriz sólida e catalisam a degradação de macromoléculas em unidades menores. Assim, o substrato é tomado pelo fungo para servir como nutrientes. O oxigênio é consumido e o gás carbônico, água, calor e outros produtos bioquímicos são produzidos durante a fermentação (HÖLKER; LENZ, 2005).

O desenvolvimento de calor leva a um aumento rápido da temperatura, que é um problema sério durante FES. O calor é, portanto, removido a partir do substrato não só através de condução, mas também por meio de evaporação, que é parte do balanço de água no sistema. Ao lado de evaporação, o equilíbrio de água inclui a absorção pelo micélio no percurso do crescimento. Essa absorção se dá através do consumo de água durante as reações de hidrólise e produção de água através da respiração. Como outro fator importante o pH local pode ser alterado devido à liberação de ácidos de carbono e a troca de amônia. Os produtos bioquímicos de interesse que são liberados na matriz sólida durante a fermentação podem ser extraído para uso posterior no final do bioprocessos. Todos estes e muitos outros fenômenos podem influenciar fortemente o desempenho do processo durante FES (HÖLKER; LENZ, 2005). A Figura 7 ilustra o crescimento de um fungo filamentosos em substrato sólido.



**Figura 7.** Representação esquemática do crescimento de um fungo filamentososo em substratos sólidos. Adaptado de HÖLKER; LENZ, (2005).

Durante todo o processo da FES, o fungo cresce rapidamente e secreta enzimas que quebram as fibras e liberam nutrientes necessários para que possa continuar a crescer. Com a variação de matérias-primas, o fungo varia sua resposta com relação ao produto desejado. A Tabela 2 apresenta os micro-organismos que se destacam na produção de proteases empregando a FES.

### 2.3.1. Substratos Agroindustriais

Os resíduos agroindustriais são os recursos mais abundantes e renováveis do planeta. O acúmulo de biomassa presente em grandes quantidades, a cada ano, resultam não só na deterioração do meio ambiente, mas também na perda de material potencialmente valioso que pode ser processado para produzir uma série produtos adicionais, tais como alimentos, combustíveis, produtos químicos, as enzimas e outras biomoléculas. (SINGH; GUPTA; ANTHWAL, 2009). Sendo, geralmente, os melhores substratos para processos de fermentação, seja ela em Estado Sólido, Semi-Sólido ou Submersa, e a produção de enzimas não é uma exceção.

**Tabela 2.** Proteases obtidas por Fermentação em Estado Sólido a partir de diferentes micro-organismos e substratos.

Micro-organismos	Substratos	Referências
<i>Aspergillus awamori</i> IOC-3914	Torta de babassu	DE CASTRO et al., (2011)
<i>Aspergillus flavus</i>	Torta de sementes de gergelim, amendoim, mostarda, algodão e farelo de trigo	KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, (2012)
<i>Aspergillus</i> ATCC16620	<i>niger</i> Sementes de tamarindo e torta de dendê	SABU et al., (2005)
<i>Aspergillus orizae</i>	Farelo de trigo e Farelo de arroz suplementado com Farinha de trigo	CHUTMANOP et al., (2008)
<i>Aspergillus orizae</i>	Farelo de trigo, casca de arroz, grãos de arroz, torta de gergelim e dendê e semente de jaca	SANDHYA et al., (2005)
<i>Bacillus subtilis</i>	Sementes de mostarda, grãos de trigo, grãos de arroz e casca de batata.	MUKHERJEE; ADHIKARI; RAI, (2008)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Grãos de arroz	SAJEED ALI; VIDHALE, (2013)
<i>Penicillium</i> sp	Grãos de soja	GERMANO et al., (2003)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PseA	Torta de sementes de pinhão-manso ( <i>Jatropha curcas</i> )	MAHANTA; GUPTA; KHARE, (2008)

Geralmente, o pré-tratamento é uma ferramenta importantíssima para a quebra da estrutura destes substratos para melhoria da utilização do substrato pelo micro-organismo. Pode-se também incorporar soluções nutritivas ao substrato, visando adequá-lo às condições nutricionais do micro-organismo para a fermentação desejada, como no caso de enriquecimento proteico quando são utilizados fontes de nitrogênio como cloreto de amônio ou sulfato de amônio; fontes de carbono quando se utiliza a glicose e o substrato; os minerais quando se utiliza fósforo e enxofre; e elementos traços como potássio e magnésio.

Quando se trata de substrato é importante salientar a granulometria. Essas técnicas permite ter um tamanho e volume de partícula padronizada. Pois, elas afetam diretamente a relação da área superficial e o ataque microbiano. Por outro lado, partículas muito menores do substrato pode interferir a respiração microbiana e pode resultar na diminuição de crescimento

ou nenhum. Ao contrário de partículas maiores que oferecem melhor aeração, devido aos espaços entre as partículas e o mesmo limitam a superfície ao ataque do micro-organismo (SINGHANIA et al., 2009).

Diante dessas propriedades dos substratos agroindustriais, a indústria biotecnológica avança com um potencial de oferecer oportunidades de aproveitamento econômico para o setor de produtividade. Isso é devido a sua disponibilidade abundante no meio ambiente que pode servir como substrato ideal para processos de produção com valor agregado a partir de micro-organismos (PANDEY et al., 2000).

Barros et al., (2013), realizaram um estudo de inclusão de manipueira, em águas, como meio de cultura para a produção de amilases, proteases e lipases por *Bacillus subtilis*, sendo identificado como bons identificadores para análises de águas.

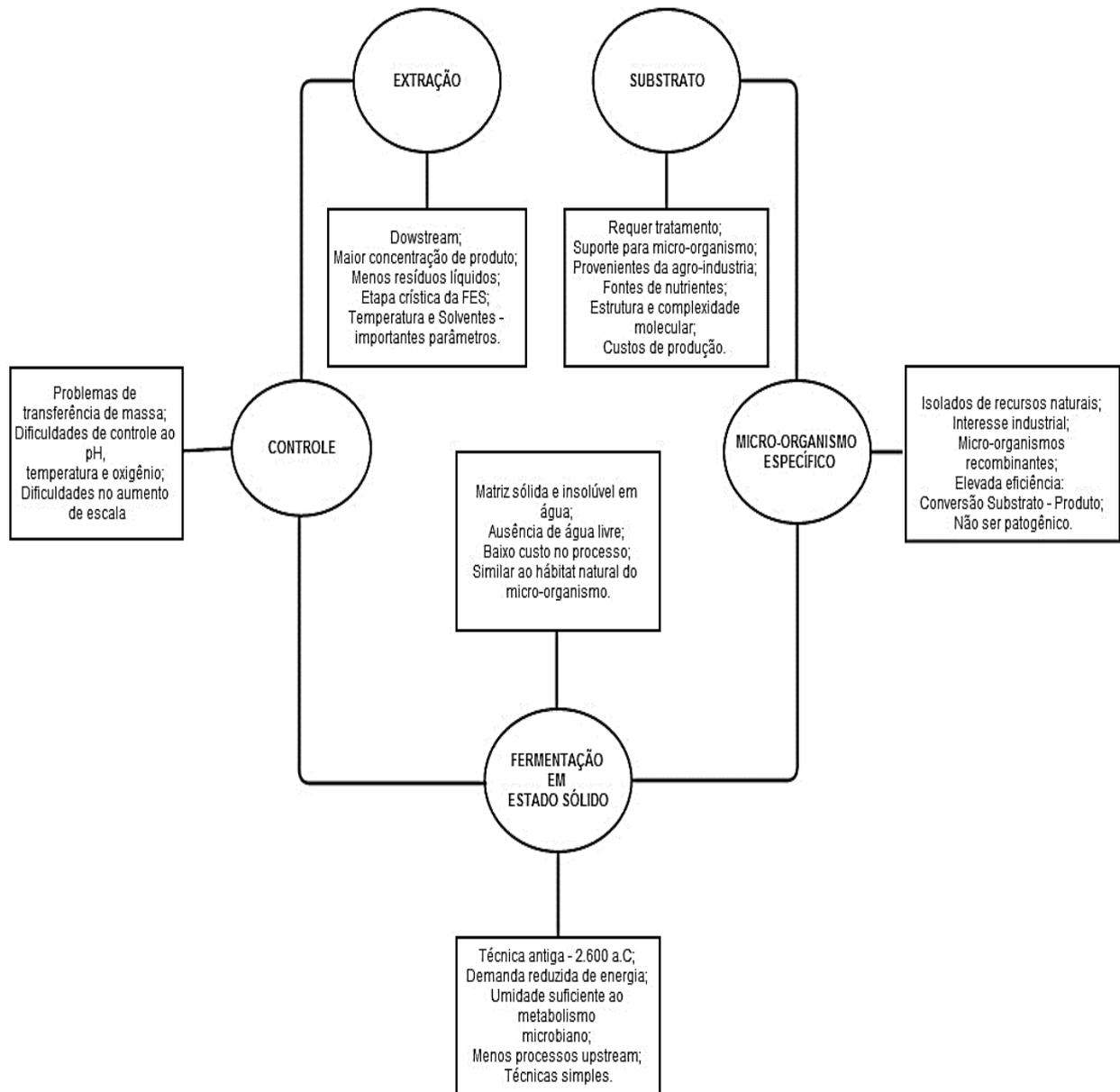
Jeronimo; Camacho; Coelho, (2013), fizeram um balanço da situação das indústrias de beneficiamento de polpas de frutas do estado Rio Grande do Norte, Brasil, com relação à disposição final dos subprodutos e o impacto associado pelas atividades desenvolvidas por estas. O resultado demonstrou um nível de criticidade com a disposição inadequada de subprodutos em locais inapropriados e baixos índices de práticas preventivas ou de (re)usos desses. Os mesmos autores propuseram uma alternativa para o reaproveitamento dos subprodutos dessas indústrias como alimentação humana ou como um alimento de origem animal e utilização para a produção de enzimas de origem microbianas.

Estudos voltados à produção de enzimas de degradação de biomassa a partir de resíduos ou substratos agrícolas baratos tem sido utilizados como substratos para fermentação em estado sólido. Delabona et al., (2013), avaliaram o efeito do teor de umidade inicial em duas linhagens de *Aspergillus* (*A. niger* P47C3 e *A. fumigatus* P40M2) isoladas da floresta Amazônica, Brasil, em substratos como fonte de carbono (farelo de trigo, bagaço de cana, farelo de soja, bagaço de laranja) e observaram que as fontes de carbonos mais eficazes para a produção de enzimas de degradação de biomassa foram farelo de trigo e de soja.

### **2.3.2. Fatores que influenciam a Fermentação em Estado Sólido**

Há diversos fatores que podem influenciar a Fermentação em Estado Sólido. Estes incluem a seleção do micro-organismo adequado e substrato, umidade, atividade de água, temperatura, oxigênio, pH e concentração de nutrientes (SINGHANIA et al., 2009). Essas condições afetam significativamente o crescimento celular e a formação do produto. Dessa

forma se pode afirmar que a observação desses fatores traz um resultado significativo ao processo de fermentação em estado sólido (Figura 8).



**Figura 8.** Fluxograma do processo fermentativo em estado sólido.

Segundo Pandey (2003), todos os processos de fermentação em estado sólido, necessitam das seguintes etapas: seleção da matéria-prima, tratamento do substrato bem como a seleção do micro-organismo, a fermentação, além do controle dos parâmetros da fermentação propriamente dita, extração e a purificação do extrato enzimático. Contudo, o mesmo autor relata que devido à exigência de alta atividade de água, culturas bacterianas poderiam não ser

adequada para FES. Não obstante, no mesmo trabalho demonstrou que as culturas bacterianas podem ser bem geridas e manipuladas para os processos de FES.

Assim sendo, é essencial o monitoramento e controle nos vários processos de fermentação para o sucesso da exploração da FES.

### 2.3.3. Umidade e Atividade de Água ( $a_w$ )

O nível de umidade do substrato é um dos principais fatores que influenciam o processo e varia pela sua natureza, bem como os requisitos do micro-organismo para seu crescimento. Um alto nível de umidade resulta em diminuição da porosidade, baixa difusão do oxigênio, um risco grande de contaminação, a redução no volume de gás e redução de troca gasosa. Além do que o baixo nível de umidade leva a um crescimento abaixo do ideal e um menor grau de absorção pelo substrato (LONSANE et al., 1985; NIGAM; PANDEY, 2009).

A água apresenta um fator importantíssimo na FES, pois é responsável pela difusão dos solutos adicionais bem como dos metabólitos produzidos pelo micro-organismo. A presença da água tem influência em parâmetros cinéticos e termodinâmicos relativos à FES que devem ser constantemente estudadas para a avaliação dos efeitos causados no processo (NIGAM; PANDEY, 2009).

A relação da água e a FES é criticamente avaliada. Conforme Pandey (2003) relatou em seu estudo em Fermentação em Estado Sólido que a atividade da água ( $a_w$ ) no substrato tem influência determinante na atividade microbiana. Em geral, o tipo de micro-organismo que pode crescer em processo de FES são determinados por  $a_w$ . A importância da  $a_w$  tem sido amplamente estudado por vários autores. A  $a_w$  do meio tem sido atribuída como um parâmetro fundamental para a transferência de massa de água e de solutos através das células microbianas. O controle deste parâmetro pode ser utilizado para modificar a produção metabólica ou excreção de bioproduto de um micro-organismo.

Para cada espécie de micro-organismo existe um valor ótimo de umidade do substrato para o crescimento celular em consonância com a temperatura. Isso foi comprovado em estudos feitos por Hamidi-Esfahani; Shojaosadati; Rinzema (2004), que o aumento de teor de água em 55% em culturas de *Aspergillus niger* nas temperaturas de 35 e 40°C diminuiu o crescimento microbiano. Todavia, a concentração da umidade do substrato pode ou não coincidir com o melhor valor para a expressão do produto que se pretende obter no processo, como por exemplo, enzimas. Esta constatação pode ser avaliada no estudo por De Paris et al. (2012), no qual

averiguaram que as maiores atividades enzimáticas no estudo para a protease foi maior quando utilizou o substrato soja convencional com umidade inicial de 50% frente ao *Aspergillus niger* em FES. Mahanta; Gupta; Khare (2008) confirmaram esta conclusão mostrando, em seu trabalho, experimentos com umidades variando de 28,6%, 50%, 66,7%, 75% e 80% para a produção de protease e lipase por *Pseudomonas aeruginosa* PseA, a partir de tortas de sementes, observando que a produção máxima foi a umidade de 50% com 6560 e 620 U/g de substrato, respectivamente. Concluindo que o baixo teor de umidade conduz a um menor crescimento e absorção do substrato que levou a diminuir a produção de enzimas pelo micro-organismo.

Para Nigam; Pandey (2009) e Pandey; Soccol; Mitchell (2000), entre os vários fatores que são importantes para crescimento microbiano devem levar em conta a atividade de água, a granulometria do substrato em particular e o nível de umidade ideal. A adição de nutrientes ao meio pode ser utilizada de forma a alcançar os níveis ideais para o desenvolvimento do cultivo.

#### **2.3.4. Transferência de Calor e Temperatura**

Uma grande quantidade de calor metabólico é produzido durante FES e isso está diretamente relacionado com as atividades metabólicas do micro-organismo e da quantidade do substrato. O calor gerado deve ser dissipado imediatamente já que a temperatura afeta a germinação de esporos, o crescimento, a formação de produto e esporulação (LONSANE et al., 1985; PANDEY, 2003). Para Raju; Divakar (2014) a temperatura é um parâmetro crítico que deve ser controlada e variada de organismo para organismo.

Estudos feitos por Mitchell; Berovic; Krieger (2000) e constatado posteriormente por Hölker; Lenz (2005) que a temperatura e a concentração de oxigênio estão intrinsicamente ligados. Isso ocorre devido o oxigênio se difundir nas reações metabólicas e liberando calor que não é facilmente dissipado por causa da baixa condutividade térmica do substrato e as dificuldades feitas com o progresso da fermentação. Consequentemente, pode se formar um gradiente de temperatura e de concentração de oxigênio excessivos dependendo dos parâmetros de controle do processo. Hölker; Lenz (2005) afirmaram ainda que o aumento da temperatura é desejável quando se aplica em compostagem da matéria, por outro lado em processos biotecnológicos são muitas vezes fatais porque uma grande maioria de enzimas pode se desnaturar pelo calor ao final do processo.

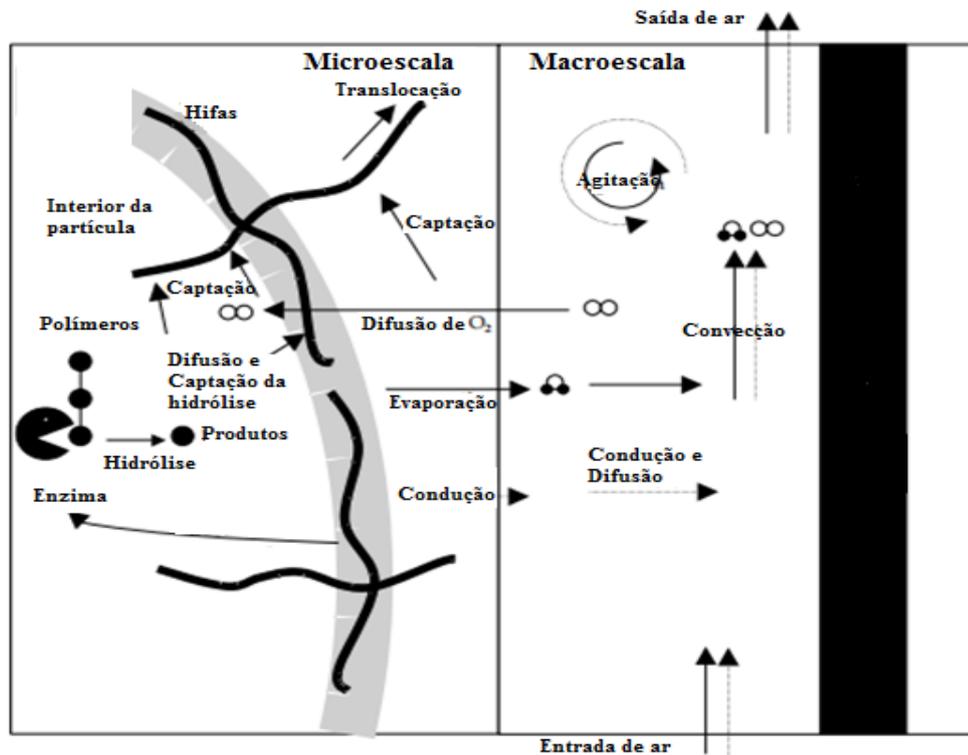
Bhunja et al. (2013) avaliaram a influência de diferentes parâmetros sobre a estabilidade de uma serino protease alcalina (70 kDa) produzida pelo *Bacillus licheniformis* NCIM-2042,

variando as temperaturas em 60, 65, 70, 75 e 80°C. Nesse estudo, verificou-se que a protease foi estável à 75°C, concluindo que a enzima teve um potencial para ser utilizada como um biocatalisador na indústria.

### **2.3.5. Aeração e Transferência de Oxigênio**

A aeração cumpre as funções básicas em um sistema como manter a aerobiose, eliminar o dióxido de carbono, regular a temperatura do substrato, ajustar o nível de umidade, além do ar circular fácil e livremente entre as partículas do substrato faz com que misture as partículas presentes no meio. A técnica de FES tem caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por uma película de líquido na superfície do substrato (Nigam; Pandey, 2009)

Viccini; Mitchell; Boit (2001) descreveram o processo da passagem de ar pela película de líquido, exemplificando a aeração em um biorreator (Figura 9), em que permite elevadas taxas de crescimento e produtividade, todavia o excesso de veiculação de ar compromete o desenvolvimento do substrato, um fenômeno chamado de secagem em que consiste na produção lenta ou nula de transferência de nutrientes e metabólitos. Para que não haja esse fenômeno é necessário controlar ou minimizar o ar, através de saturação em vapor de água (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000). Visto que o arejamento desempenha um papel importante em fermentações de estado sólido em relação à FS onde, apenas, ajuda na transferência de gás no processo.



**Figura 9.** Processos em micro e macroescala envolvidos em um processo de FES. Adaptado de VICCINI; MITCHELL; BOIT, (2001).

### 2.3.6. pH

O crescimento microbiano é geralmente afetado significativamente pelo pH da fermentação. Isso tem importantes consequências para os processos de FES devido os gradientes de pH surgirem dentro das partículas de substrato, e embora as correções do pH nas soluções nutritivas podem ser adicionadas para diminuir a faixa de variação e não prejudicar o crescimento celular e a produção da biomolécula. Entretanto, o controle de pH, durante a FES, não é fácil de ser realizado (MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2000).

A boa capacidade de tamponamento de alguns substratos utilizados na FES como tampão Fosfato, Citrato, Sais de amônio, Ureia, entre outros, ajudam eliminar a necessidade de controle de pH durante a fermentação (LONSANE et al., 1985). Um outro problema relatado pelo autor são as mudanças de pH em locais do substrato, produzindo aglomerados em cima de uma película sobre o sólido, verificando a baixa produtividade e desenvolvimento do micro-organismo.

Nigam; Pandey, (2009) reafirmaram que mesmo sendo difícil o controle de pH durante a FES, essa variável é significativa para o meio em que o micro-organismo pretende ser cultivado. Essa variável como outras são específicas para cada processo da FES e para o produto a ser

obtido. A dificuldade relatada por Mitchel; Berovic; Krieger (2000) e Nigam; Pandey (2009) em relação ao controle de pH nos substratos sólidos se resume na medida no teor da umidade dos sólidos sem qualquer líquido livre no meio da fermentação associados a temperatura de crescimento do micro-organismo cultivado que é diferente da temperatura ótima para a formação do produto.

Nigam; Pandey (2009) afirmaram ainda que os níveis de pH locais em superfícies sólidas perto da qual a atividade biológica ocorre, pode ser considerável diferente do pH da fase líquida, ou seja dos metabólitos que são produzidos no bioprocessamento. Há diferenças em níveis de pH em relação aos efeitos de carga de superfície do substrato e equilíbrios iônicos modificados pelos transportes de solutos através da umidade, aeração e crescimento das hifas adjacentes do micro-organismo. Não há um método adequado para medir o pH preciso da fermentação dos resíduos sólidos. Contudo, é mais fácil de medir a temperatura do sistema da FES à medição de pH.

#### **2.4. Aplicação das Proteases na Indústria**

É constatável pelo mercado de enzimas que as proteases são as biomoléculas mais comercializadas no mundo (DUDHAGARA et al., 2014), havendo um interesse renovado no estudo de enzimas proteolíticas, principalmente por causa de seu importante papel nos processos metabólicos celulares que ganhou a atenção substancial na comunidade industrial (DUDHAGARA et al., 2014; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Vários setores industriais como detergentes, alimentos, farmácia, couro e recuperação de íons metálicos, têm utilizado proteases como uma ferramenta de produção, recuperação de produtos e subprodutos (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

A indústria de enzimas, é o resultado de um rápido desenvolvimento da evolução da biotecnologia moderna. Conhece-se desde os tempos antigos que as enzimas já eram utilizadas de forma empírica na produção de alimentos, como queijo, fermento, cerveja, vinho e vinagre, e no fabrico de produtos tais como couro, índigo e linho. Por outro lado, especificamente para a produção de enzimas, o uso de linhagens selecionadas, tornou-se possível purificar e caracterizar as enzimas em larga escala (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Na indústria de alimentos, as proteases são usadas em muitos produtos, incluindo, cerveja, vinho, cereais, panificações e queijos com a utilização da quimosina (EC 3.4.23.4) (MONTEIRO; SILVA, 2009). No que concerne à fabricação de queijos, a coagulação do leite é o passo fundamental na produção (SHIEH; PHAN THI; SHIH, 2009). A quimosina é usada convencionalmente como agente coagulante do leite na indústria de laticínio

(NEELAKANTAN; MOHANTY; KAUSHIK, 1999) e obtida através de DNA recombinante do gene pro-quimosina bovina inserida nos gens de *Escherichia coli* K-12 (MONTEIRO; SILVA, 2009). Devido, a produção e ao consumo de queijos, o setor biotecnológico tem estimulado pesquisas para fontes alternativas de produção de enzimas coagulantes do leite. Ademais, estudos com extratos da flor da alcachofra (*Cynara scolymus*) como substituto da quimosina, tem sido reportado na literatura como sendo adequado para substituir o coalho animal (abomaso bovino) para a produção de queijo do tipo Gouda (LLORENTE et al., 2014).

No entanto, a atenção tem sido voltada para a produção de enzimas coagulantes do leite de fontes microbianas, devido à redução de oferta de coalho animal e a otimização da tecnologia de DNA recombinante. Embora haja diversos micro-organismos que produzem enzimas de interesse na indústria de laticínios, apenas as enzimas de coagulação de leite produzidas por linhagens de *Aspergillus orizae*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizomucor pusillus* var. Lindt e *Enthothia parasitica* são amplamente utilizadas (SHIEH; PHAN THI; SHIH, 2009).

As proteases com alta atividade e estabilidade na faixa alcalina e temperatura são interessantes para aplicações nos setores de bioengenharia e biotecnologia. Sua principal aplicação é na indústria de detergentes, devido seu pH ser geralmente na faixa de 9,0 - 12,0 e usualmente resistem a elevadas temperaturas o que permite o uso de detergentes em sistemas de lavagem a quente. As proteases alcalinas são utilizadas como aditivos em detergentes para facilitar a liberação de proteínas (HAJJI et al., 2010).

A indústria farmacêutica é um dos maiores produtores e usuários de proteases. Elas podem ser aplicadas tanto na produção de medicamentos e desenvolvimento de outros produtos farmacocômicos, quanto em diagnóstico e terapia (MONTEIRO; SILVA, 2009). Diante da diversidade de aplicação das proteases, atualmente vai desde o auxílio em digestão, debridamento e cicatrização até terapias antitumorais (MONTEIRO; SILVA, 2009). As principais proteases utilizadas em terapias são: *Plasmina* (EC 3.4.21.7) com aplicação como agente fibrinolítico (SALES et al., 2013), cicatrizante de feridas; *Papaína* (EC 3.4.22.2) como auxílio na digestão de proteínas (BERTI; STORER, 1995). Contudo, as cisteíno proteases, que são membros da superfamília da papaína, desempenham um papel importante na infecção, replicação, desenvolvimento e metabolismo de parasitas protistas; *Quimiotripsina* (EC 3.4.21.1) auxilia na digestão (WIŚNIEWSKI; MANN, 2012); *Bromelina* (EC 3.4.22.32) é empregada em processos inflamatórios, digestão e queimaduras de grau elevado (SECOR et al., 2005); *Colagenase* (EC 3.4. 24.3) é aplicada em cicatrização de feridas (ROSSO et al., 2012), debridamento de queimaduras e úlceras dérmicas (MONTEIRO; SILVA, 2009).

## 2.5. Purificação de Proteínas

A purificação de proteínas e de outros compostos biotecnológicos, produzidos por microorganismos, vegetais ou animais, compõem etapas complexas devido à natureza de biomoléculas produzidas como as proteínas, aos carboidratos, antibióticos e aminoácidos (SILVA, 2013). Além disso, as proteínas são produzidas juntamente a outras de menor interesse, tornando-se a etapa mais desafiante do que a produção, pois não há processos de purificação de aplicação geral (PORTO, 2008). Essas limitações deixam o processo de separação mais dispendioso por necessitarem muitas etapas até que se tenha a molécula pura (SILVA, 2013).

Entretanto, as separações dos produtos obtidos nos processos de purificação podem ser limitadas, devido a sua dificuldade e complexidade dos processos aplicados a produtos que são sensíveis ao pH, temperatura e concentrações do substrato ao longo do bioprocessamento. A separação de um produto biológico custa cerca de 50 a 80% de todo o processo de purificação (PEI et al., 2009), essas porcentagens podem, ainda, ser maiores, constituindo 90% de todo o processo de purificação (PORTO et al., 2008) o que deixa oneroso para a indústria biotecnológica.

A literatura reporta purificação de proteínas envolvendo técnicas, tais como cromatografia por afinidade (PINA; BATALHA; ROQUE, 2014), cromatografia por troca iônica (MARKELY et al., 2014), “cutting-gel” de eletroforese (CAI et al., 2012) e Sistema de Duas Fases Aquosas (DING et al., 2014).

Porto et al.(2008) afirmaram que os métodos tradicionais para isolar e purificar proteínas envolvem vários passos, o que tornam ao final do produto dispendioso; asseverando o SDFA como alternativa. A pesquisa corrobora com um estudo feito por Pei et al. (2009) que sugerem processos e aplicações utilizando extração líquido-líquido de proteínas como método de purificação, ao invés dos métodos tradicionais. Neste caso requerem tempo e alto custo de consumo, pois podem induzir a perda da atividade biológica e reduzir o rendimento de todo o processo. Os mesmo autores sugerem como alternativa interessante o Sistema de Duas Fases Aquosas, devido à combinação de várias etapas de processamento e características numa única operação. Asenjo; Andrews (2011) acrescenta que o SDFA têm sido utilizados cada vez mais para desenvolver bioprocessos para a recuperação e purificação de vários produtos biológicos, incluindo proteínas, material genético, bionanopartículas, células e organelas.

Diante do exposto, o desenvolvimento de técnicas e métodos de separação e purificação de proteínas ou outros compostos bioativos são um importante pré-requisito para a maioria dos avanços da indústria biotecnológica que visam produção em larga escala, altos graus de purificação, atividade biológica estável e baixo custo de purificação (ASENJO; ANDREWS, 2011)

### **2.5.1. Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa)**

O Sistema de Duas Fases Aquosas foi descrito pela primeira vez por Martinus Beijerinck em 1896, quando ele ao misturar duas soluções aquosas imiscíveis a base de ágar e soluções de amido ou gelatina descobriu que formavam um sistema de duas fases (RESCHKE; BRANDENBUSCH; SADOWSKI, 2014). Depois de sua descoberta, em 1956, Per-Ake Albertsson descreveu o uso de SDFa, observando a mistura de 1% de dextrana e 1% de metilcelulose dando origem ao sistema de duas fases; uma fase, contendo mais dextrana e a outra fase mais metilcelulose. Posteriormente, Albertsson descobriu ao misturar polietileno glicol (PEG), dextrana e água, e assim como PEG, cloreto de sódio e água formavam um sistema de duas fases aquosas (ALBERTSSON, 1962) para a purificação de biomoléculas e partículas celulares (RESCHKE; BRANDENBUSCH; SADOWSKI, 2014).

Observa-se que desde 1950 os processos biotecnológicos tem se desenvolvido em técnicas e métodos cada vez mais importantes para separação de compostos como proteínas, organelas e células como mostra um trabalho clássico de Albertson (1986) e a partição de hemoglobina, lisozima, e glicose-6-fosfato desidrogenase por Johansson et al. (2008), além de um estudo com técnicas de separação de 15 proteínas de Ferreira et al. (2014), utilizando extração líquido-líquido. Nos últimos anos, a separação de proteínas e outras biomoléculas tem sido estudada por muitos pesquisadores como reportado por Salmon et al. (2014) que utilizaram um sistema de duas fases aquosas para a purificação parcial de fitase produzida por *Schizophyllum comuna* por FES, concluindo que a extração líquido-líquido pode ser utilizada como o primeiro passo para o processo de purificação.

Foi diante da possível utilização do sistema, melhor descrito por Albertsson, que vários grupos de pesquisadores, atualmente, focados na aplicação do SDFa para a purificação de alto valor de bioprodutos como polipeptídeos, enzimas, proteínas terapêuticas e outras biomoléculas como DNA, RNA, antibióticos além de íons metálicos (RESCHKE; BRANDENBUSCH; SADOWSKI, 2014), conseguiram fixar como promissor para separar e purificar vários produtos biológicos.

Os sistemas de duas fases aquosas são formados geralmente por uma solução aquosa pela mistura de dois polímeros ou de um polímero e um sal. De acordo com a concentração crítica dos componentes no sistema induz a separação de fases, predominando em cada fase um polímero ou um sal ou, ainda, um polímero e um polímero (HATTI-KAUL, 2001).

O SDFA têm algumas vantagens em comparação com outras técnicas comumente utilizadas de separação e purificação. As vantagens podem ser resumidas como o alto teor de água de ambas as fases 70-85% (m/m), alta biocompatibilidade, baixa tensão interfacial, baixa degradação de biomoléculas, boa resolução e alto rendimento de separação, baixo custo de material e a possibilidade de reciclagem de polímero e de sal (MOKHTARANI et al., 2008). Para Gavasane; Gaikar (2003) o teor de água no sistema pode chegar até 90% (m/m), confirmando que em ambas as fases é altamente biocompatível com as técnicas de biosseparação, permitindo condições não desnaturantes para as biomoléculas.

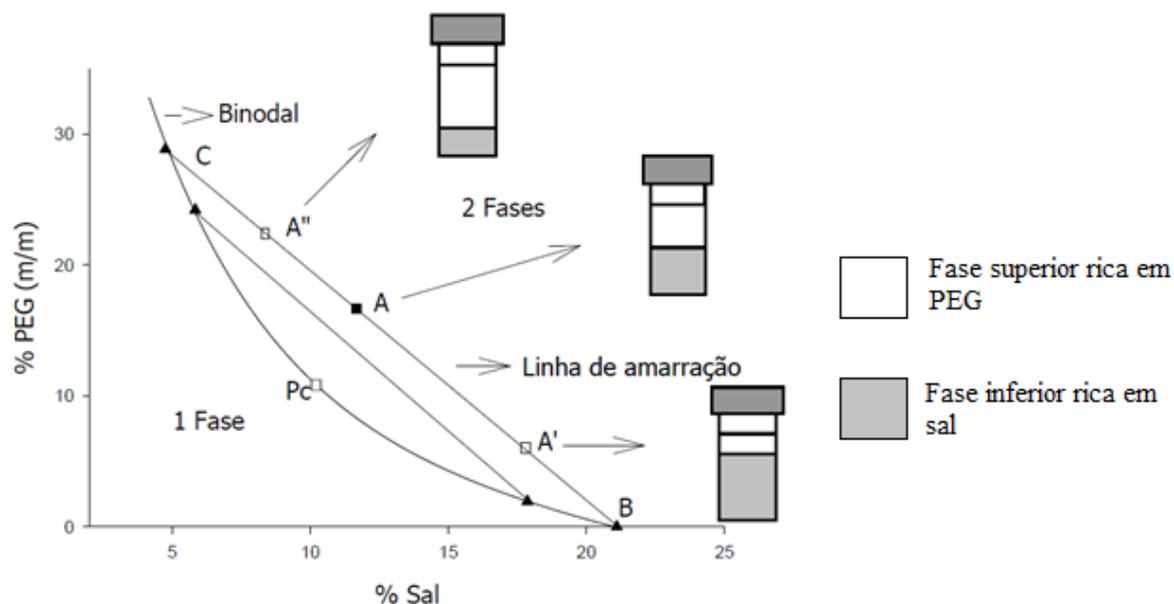
As ótimas condições para o rendimento e fatores de purificação tem sido verificado em várias pesquisas. Isso é devido aos estudos experimentais dos efeitos das variáveis que influenciam o sistema, através de um planejamento. Pericin; Madarev-Popović; Radulović-Popović (2009) purificaram Aspergillopepsina I, uma protease ácida, utilizando SDFA composto por várias combinações de PEG, Fosfato de Sódio Bibásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) e Cloreto de Sódio ( $\text{NaCl}$ ), obtendo um rendimento de 99% na fase em uma única vez. O SDFA foi utilizado por Rosso et al. (2012) para extração de uma colagenase produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM4622, o sistema mostrou-se satisfatório com um rendimento de 242% e fator de purificação 23,5, constituindo uma ferramenta viável para recuperar enzimas. O resultado desse estudo viabilizou uma perspectiva de trabalhos futuros, permitindo condições de trabalhos já operados para extração da colagenase.

O desenvolvimento da extração líquido-líquido está na constituição do sistema e por vezes muito limitado. Sistemas aquosos de Polímero-Sal diferem ao tradicional sistemas de Polímero-Polímero devido à uma viscosidade mais baixa, a maior densidade e menor custo da fase de sal, quando comparado com o fase polímero. Assim, o polietilenoglicol (PEG) tem sido combinada com citrato de sódio ou fosfato de sódio para formar SDFA. Esses sistemas possuem propriedades físicas favoráveis na separação das fases (NEVES et al., 2012). A escolha do sistema é muito influenciada por questões legais, no que diz respeito ao meio ambiente, tanto o PEG e a Dextrana são atóxicos e não causam problemas ambientais. Por outro lado, a Dextrana é o polímero mais comum utilizado com o PEG, mas é de custo elevado o que inviabiliza o seu uso em larga escala. No que concerne aos sistemas PEG-sais são mais atrativos devido ao baixo

custo, rápida separação de fases e baixa viscosidade. Sendo que podem aumentar a desnaturação da biomolécula em altas concentrações (PADILHA et al., 2011).

A escolha do SDFA composto por PEG-sal pode ser feito utilizando sais de citrato/fosfato/sulfato, os mais utilizados nesse processo. Aos que optam para um sistema com fase de citrato visam um composto biodegradável e não tóxico ao ambiente, formando um SDFA ambientalmente seguro que são adequados para extração de materiais biológicos (NEVES et al., 2012). Subsequente, aos que preferem sais de fosfato é baseado em seu baixo custo e alto coeficiente de partição de biomoléculas em relação a outros sais (PADILHA et al., 2011). Durante os últimos anos, tem havido um interesse renovado em métodos de separação de moléculas biológicas, através de técnicas cromatográficas. A cromatografia envolve altos custos, operação em lote, baixo rendimento e complexidade em “scale-up”. Sistemas de duas fases aquosas, recentemente, têm sido propostos para a purificação de anticorpos, enzimas e outras biomoléculas (LOW; O’LEARY; PUJAR, 2007). Rosa et al. (2011) estudaram a sustentabilidade econômica e ambiental de extração de uma proteína A por SDFA que atualmente se utiliza a técnica de cromatografia por afinidade para o processo de purificação. O processo SDFA é considerado vantajoso em termos de economia. No mesmo trabalho a equipe de pesquisadores afirmam que são capazes de purificar continuamente a mesma quantidade de proteína reduzindo os custos operacionais de 14,4 para 8,5 milhões de dólares por quilo de cultura de células processadas com a proteína A nos Estados Unidos da América, EUA.

A formação de duas fases durante o processo de mistura de soluções aquosas de dois polímeros (ou de um polímero ou de um sal) dependerá das interações intermoleculares, expressas em energia livre entre os constituintes formadores do sistema. Serão também estas mesmas interações as responsáveis por todas as propriedades físico-químicas presentes nas duas fases, sendo necessário o conhecimento do comportamento das fases (SILVA; LOH, 2006). Para este comportamento segregativo, pode-se dizer, ou associativo dos componentes formadores de SDFA são geralmente efetuados diagramas de fases, mostrando a composição dos constituintes em cada região, como mostra a Figura 10.



**Figura 10.** Diagrama de fases para Sistemas de Duas Fases Aquosas, expressas em coordenadas retangulares. Adaptado de COSTA, (2010).

Como representado na Figura 10, o diagrama de fases, pode ser dividido em duas regiões por uma linha convexa chamada binodal ou curva de equilíbrio. Sistemas cuja composição fica abaixo da binodal formam uma fase somente, enquanto que sistemas cuja composição se situa acima da binodal formam duas fases homogêneas. Convencionalmente, os componentes presentes em maior quantidade nas fases inferior e superior são representados no eixo das abscissas e das ordenadas, respectivamente. A quantidade de água é calculada por diferença (LI et al., 2010).

Na Figura 10, a linha amarração (ponto A) determina a composição global do sistema, fornecendo a concentração dos solutos nas duas fases em equilíbrio, representadas pelos pontos C (fase superior) e B (fase inferior). Qualquer conjunto de pontos globais ou de mistura (A, A', A'') que pertença à região bifásica e que esteja sobre a mesma linha de amarração fornecerá fases superiores que possuirão propriedades termodinâmicas intensivas iguais (composição, densidade, volume molar, entalpia molar, etc.), entretanto, sendo distintas as suas variáveis termodinâmicas extensivas (massa, volume, etc.). Aplica-se o mesmo raciocínio para as fases inferiores formadas a partir de composições globais localizadas sobre uma mesma linha de amarração. O ponto crítico (Pc) é uma particularidade do sistema, teoricamente, as propriedades físico-químicas das duas fases são iguais (ASENJO; ANDREWS, 2011)

### **2.5.1.1. Fatores que influenciam no Sistema de Duas Fases Aquosas**

São diversas variáveis que influenciam no sistema de duas fases aquosas para a partição da biomolécula. Entretanto, as propriedades físico-químicas influenciam fortemente o seu particionamento em SDFA, sendo que para cada sistema formado por polímero-polímero ou polímero-sal existe um diagrama de fases que define as proporções entre seus componentes. Todavia, ao iniciar um trabalho com um novo sistema, recomenda-se a construção de um diagrama adequado às condições de trabalho a serem utilizados na extração como temperatura, pH, massa molar do PEG e adição de suspensão biológica (ALBERTSON, 1986).

Asenjo e Andrews (2012) acrescentaram que essas condições que influenciam o particionamento pode ser explorado individualmente ou em conjunto para atingir uma separação eficaz de uma biomolécula especial. As propriedades ou condições a que o autor se refere são a hidrofobicidade, onde as propriedades hidrofóbicas de uma fase do sistema são utilizadas para a separação de acordo com a hidrofobicidade da biomolécula; eletroquímica, onde o potencial elétrico entre as fases são usadas para moléculas ou partículas separadas de acordo com a sua carga; o particionamento dependente do tamanho das moléculas ou da área de superfície das moléculas, constituindo um fator preponderante; e a afinidade bioespecífica, em que a afinidade entre os locais nas biomoléculas e ligantes dos polímeros de fase são utilizadas para a separação, levando em consideração a conformação, no qual é um fator determinante.

No trabalho de Asenjo e Andrews (2011), o efeito da massa molar dos polímeros depende da massa molar da biomolécula a ser separada. Por exemplo, as proteínas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar. Posteriormente, Asenjo e Andrews (2012) reforçaram que os fatores como peso molecular e tamanho de polímeros é crucial no particionamento de uma proteína em sistema de duas fases aquosas, seguidos das condições já mencionadas.

#### **2.5.1.1.1. Efeitos da carga (pH)**

As interações eletroquímicas pode ter um papel importante sobre o comportamento de partição de proteínas (ASENJO; ANDREWS, 2011). Como cargas opostas se atraem, a presença de constituintes carregadas pode gerar um fracionamento seletiva de solutos e proteínas com

cargas opostas para uma fase específica. A influência do pH sobre as interações eletroquímica é fundamental. Portanto, o pH do sistema pode ser manipulado, a fim de promover a separação seletiva da biomolécula. A utilização de valores de pH acima do ponto isoelétrico (pI) da proteína pode induzir uma afinidade adicionais para a fase rica em PEG. Correlações para descrever o efeito de carga e densidade de carga (medido quer por unidade de superfície da proteína ( $S_p$ ) ou por unidade de volume da proteína ( $V_p$ )) de proteínas com os seus coeficientes de partição em SDFa têm sido investigados (ASENJO; ANDREWS, 2011).

Foram utilizados sistemas de PEG 4000/fosfato, sulfato, citrato e dextrana, na presença de baixos (0,6 % , m/m) e altos (8,8 % , m/m) níveis de NaCl para um estudo de 12 proteínas (ANDREWS; SCHMIDT; ASENJO, 2005). A carga e densidade de carga de superfície das proteínas foi determinada ao longo de uma gama de valores de pH (3-9). Foi observado que na ausência de NaCl, o coeficiente de partição ( $K$ ) diminuiu ligeiramente com o aumento da carga positiva. Em concentrações elevadas de NaCl,  $K$  aumentou como uma função de carga positiva. Isto sugere que a fase rica em PEG, superior, tornou-se mais negativa do que a concentração alta de NaCl nos sistemas e, por conseguinte, atraiu as proteínas carregadas positivamente (ANDREWS; SCHMIDT; ASENJO, 2005; ASENJO; ANDREWS, 2011). Os sais provocam mudanças na carga eletrostática do SDFa e influenciam na distribuição de proteínas e aminoácidos (SHANG et al., 2004).

#### **2.5.1.1.2. Efeitos do peso molecular da biomolécula**

Uma vez que as proteínas tem um tamanho, peso molecular e do diâmetro hidrodinâmico isso conferindo o seu particionamento no SDFa, bem como a geometria (conformação tridimensional) são submetidos aos efeitos estéricos impostas pelos componentes do sistema. Estes efeitos estéricos são tipicamente relacionada com o volume disponível para os solutos a ser fracionada para uma fase particular e são geralmente conhecido como o efeito de volume livre (ASENJO; ANDREWS, 2011).

#### **2.5.1.1.3. Efeitos da massa molar do polietilenoglicol**

O efeito da massa molar dos polímeros depende da massa molar da biomolécula a ser separada. Por exemplo, as proteínas com massas molares maiores são mais influenciadas pelas

mudanças na massa molar dos polímeros que as proteínas com pequena massa molar (ASENJO; ANDREWS, 2011).

Por sua vez, um aumento da massa molar do polímero geralmente diminui a partição de material biológico para a fase rica nele. Contudo, quanto maior for esta massa, menor será o volume de solvente disponível, o que implica em uma diminuição de solubilidade das proteínas na fase rica em polímero (ALBERTSSON, 1986).

Ainda em relação ao polímero, tem sido demonstrado que o sistema de fases desloca-se em direção à região bifásica com o aumento de sua concentração e da viscosidade das fases, consequentemente, isto influencia a partição da proteína-alvo. Além disso, a concentração do polímero a ser usada para a separação de fases depende da massa molar do mesmo (ASENJO; ANDREWS, 2012).

#### **2.5.1.1.4. Efeitos da adição de sais**

A composição do sal é outra variável de grande importância na partição de todas as espécies de moléculas e partículas celulares. Embora os sais se separem igualmente entre as fases, existem diferenças significativas no coeficiente de partição das proteínas em função do tipo de sal (HATTI-KAUL, 2001;ASENJO; ANDREWS, 2011).

Os sais de fosfato têm maior afinidade pela fase inferior do sistema de duas fases, o lítio tem maior afinidade pela fase superior e o NaCl tem afinidade para ambas as fases. Portanto, os sais que possuem distribuição diferenciada entre as duas fases são importantes para o sistema, pois eles terão grande influência na diferença de potencial elétrico entre as fases. Por exemplo, a partição dos íons fosfato para a fase inferior cria um potencial elétrico com uma carga negativa nesta fase que força a partição das macromoléculas ou células carregadas negativamente para a fase superior. Com o aumento da concentração de NaCl, o efeito da distribuição desigual dos íons fosfato pode ser reduzido ou eliminado. Com isto, a mudança na composição iônica pode influenciar, e muito, o coeficiente de partição de uma molécula (HATTI-KAUL, 2001; ASENJO; ANDREWS, 2012).

#### **2.5.1.1.5. Efeitos da temperatura**

O efeito da temperatura varia de acordo com o tipo de sistema utilizado. Para o sistema PEG/dextrana, foi constatado que para que ocorra a separação das fases é necessária uma

concentração maior dos polímeros à medida que a temperatura é elevada. Neste caso, para que a separação das fases seja favorecida, deve-se trabalhar em temperaturas inferiores à ambiente. Já para PEG/sal, ocorre justamente o contrário, pois em temperaturas maiores ou próximas à ambiente a separação das fases do sistema é facilitada e o aumento da temperatura favorece o aumento da concentração de PEG na fase superior do sistema e conseqüentemente ocorre uma redução da concentração do polímero na fase inferior (ZASLAVSKY, 1992; HATTI-KAUL, 2001).

Portanto, deve-se compreender como essas variáveis atuam de forma a influenciar as características do SDFa e a partição das moléculas para se obter êxito no processo de purificação.

#### **2.5.1.1.6. Efeitos da hidrofobicidade na partição da biomolécula**

As interações hidrofóbicas têm um papel importante no fracionamento de proteínas na maioria do SDFa. Dois efeitos, conhecidos, estão envolvidos em tais interações: o efeito da hidrofobicidade da fase e o efeito salting-out (ASENJO; ANDREWS, 2011). O efeito hidrofóbico da fase está diretamente relacionada com a identidade química dos componentes do sistema, bem como a sua concentração. Embora, os constituintes de um SDFa são em princípio hidrofílico, sendo que, relativamente, a sua hidrofobicidade irá variar. Assim, apesar de ambas as fases do SDFa são bastante hidrofílica, a fase superior (geralmente de PEG) é mais hidrofóbica. Isso favorece a partição proteínas hidrofóbicas para essa fase particular. Em sistemas de polímero-sal a hidrofobicidade da fase pode ser manipulada deslocando a curva binodal, conseqüentemente variando as linhas de amarração da tie-line (TL), com o peso molecular do polímero e/ou por adição de um sal. Quando o TL aumenta uma redução intrínseca de o teor de água é alcançada. Portanto, o sistema torna-se mais hidrofóbico devido ter menos água disponível no SDFa. Com relação ao peso molecular do polímero, tal como o peso molecular do polímero aumenta, a razão dos grupos hidrofílicos/hidrofóbicos diminui, provocando um aumento na hidrofobicidade. Na maioria dos casos a divisão da proteína hidrofóbica pode ser aumentada até várias ordens de grandeza; enquanto o particionamento de contaminantes, em tais condições, não seriam afetados ou tende a preferirem a fase inferior(ASENJO; ANDREWS, 2012). As proteínas que têm sido separadas com sucesso em tais sistemas incluem a taumatina,  $\alpha$ -amilase, tPA (ativador de plasminogênio tecidual) e anticorpos monoclonais (ASENJO; ANDREWS, 2011).

## 2.6. Caracterização Enzimática

A caracterização enzimática se faz necessário para conhecer as particularidades dos catalisadores como a termoestabilidade e variações ao pH, atrelando-se as condições ideais para uma atividade catalítica e aplicações industriais (HAKI, 2003; NIGAM, 2013).

A caracterização das proteases variam de acordo com os organismos que as produzem. Sabendo que as proteases podem ser produzidas de diversas origens, tais como micro-organismos, plantas e animais. (RAO et al., 1998). Conhecer bioquimicamente a enzima viabiliza o emprego da mesma em reações industriais que necessitam de produção e duração em larga escala em razão do tempo (NIGAM, 2013).

Estudos vêm sendo desenvolvidos para caracterizar enzimas de fungos do gênero *Aspergillus* a fim de determinar sua aplicação ou viabilidade no desenvolvimento de produtos de interesses industriais. Karthic et al. (2014) mostraram o potencial de produção, através da caracterização, de uma protease extracelular com pH e temperatura ótima, 6,0 e 35°C, respectivamente, por *Aspergillus oryzae*, a fim de isolar de diferentes micro-organismo do solo, para aplicações biotecnológicas que o bioprocessamento não demande em pH e temperatura muito altas. Sankeerthana; Pinjar; Jambagi (2013) compararam a caracterização da produção de proteases por duas linhagens de *Aspergillus* (*A. niger* e *A. flavus*) frente à otimização da temperatura e pH, 37°C e 9,0, respectivamente, concluindo que a compatibilidade do *A. niger* com as necessidades de produção da indústria de detergente é bastante elevada e, portanto, pode ser explorada com sucesso.

Delabona et al. (2013) caracterizaram as enzimas envolvidas na degradação da biomassa, utilizando diferentes substratos, sob à influência de pH e temperatura, por *Aspergillus niger* P47C3 e *Aspergillus fumigatus* P40M2, da Floresta Amazônica, Brasil. Nesse trabalho, os autores apontaram um interesse para estudos relacionados com a aplicação industrial do *Aspergillus fumigatus* P40M2 por apresentar atividades máximas em pH ácido, faixa entre 3,0 e 6,0, e temperaturas entre 50 e 65°C, o que demonstrou o potencial do micro-organismo para a produção de enzimas acidófilas e termófilas para a degradação da biomassa agroindustrial.

### 2.6.1. Cinética Enzimática

O estudo cinético da enzima purificada constitui a informação relativa às taxas de ativação e inativação de enzimas e realmente da velocidade de como um processo ocorre. Os parâmetros

cinéticos que controlam as taxas de uma reação catalisada por enzimas são as seguintes: O tempo de incubação; a concentração inicial de substrato; a concentração inicial da enzima; o pH; e a temperatura da reação (DUTTA; DUTTA; BANERJEE, 2005; NEJAD et al., 2014).

Monteiro e Silva (2009), afirmam que a **Equação de Michaelis-Menten** é de grande importância no campo da enzimologia, pois permite cálculos de velocidade e valores de afinidade de ligações entre enzimas obtidas de diferentes extratos e com um determinado substrato. Assim, a atividade das enzimas pode ser escrita em termos de  $V_{max}$ , ou seja, quando a velocidade da reação aumenta com a concentração do substrato até a saturação da enzima pelo substrato. O  $K_m$  (Constante de Michaelis-Menten) permite compreender a função da enzima que catalisa uma reação específica, isto é, onde menores valores dessa constante significa maior afinidade pelo substrato (SIQUEIRA et al., 2011). A Equação (1) de Michaelis-Menten pode ser descrita da seguinte forma:

$$V_0 = \frac{V_{máx}[S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

A equação de Michaelis-Menten expressa a relação quantitativa entre a velocidade inicial ( $V_0$ ), a velocidade máxima ( $V_{máx}$ ) e a concentração inicial do substrato, todas relacionadas através da constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ).

Aplicando-se a este esquema cinético a aproximação do estado estacionário (aproximação de Bodenstein) para a concentração do complexo enzima-substrato obtemos a famosa equação de hipérbole retangular de Michaelis-Menten para a velocidade inicial da reação que está descrita na Equação (1).

As proteases, como as demais enzimas, são catalisadores biológicos, e agem em grupos funcionais específicos, catalisando reações de forma estereoespecíficas, formando um ou dois enantiômeros possíveis (NELSON; COX, 2011; NEJAD et al., 2014).. Ademais, diminui a energia de ativação ( $E_a$ ) da reação de degradação de substâncias proteicas que é a energia mínima para formação do estado de transição enzima-substrato e por fim o produto.

A equação de Michaelis-Menten pode ser transformada algebricamente em componentes inversos simplesmente tomando as recíprocas dos dois lados da equação, obtendo-se a **Equação de Lineweaver-Burk** (Equação 2), também denominada de “duplo-recíproco”. A representação duplo-recíproca tem a vantagem de permitir uma determinação mais acurada de  $V_{máx}$  e a  $V_0$ . A utilidade de plotar o gráfico duplo-recíproco é compreender a diferença entre certos tipos de mecanismos de reação enzimática e na análise da inibição de enzimas (NELSON; COX, 2011; NEJAD et al., 2014).

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x} [S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (2)$$

Onde,  $V_0$  é a velocidade inicial da reação (U/mL),  $V_{m\acute{a}x}$  é a velocidade máxima,  $[S]$  a concentração do substrato (mg/mL) e  $K_m$  a constante de Michaelis-Menten.

No estudo da cinética de inativação térmica de enzimas faz-se necessário o conhecimento de alguns parâmetros, que tornam possível a determinação do melhor binômio tempo/temperatura. O valor de redução decimal (D) representa a resistência a uma determinada temperatura, enquanto o valor (z) é expresso em °C e equivale à dependência da mudança de temperatura para a desnaturação do fator termodegradável. Esse parâmetro indica o intervalo em que a temperatura, sendo aumentada ou diminuída, gera a mudança de um ciclo logarítmico no valor D (HEIDTMANN et al., 2012).

O coeficiente de temperatura ( $Q_{10}$ ) por sua vez denota o quanto mais rápido uma reação (no caso a inativação enzimática) ocorre quando a temperatura é elevada de 10°C. O bom entendimento do significado destes parâmetros aliado à correta manipulação matemática permite prever o comportamento da cinética de inativação para condições não executadas experimentalmente, ou seja, a partir dos dados de alguns ensaios, é possível prever resultados em sistemas reais não estudados (FONTAN et al., 2012).

### 2.6.2. Termodinâmica Enzimática

A termodinâmica é um dos ramos da física diretamente aplicados à bioquímica. Variáveis como entropia, entalpia e energia livre são os pilares da compreensão de vários processos biológicos, como o dobramento de proteínas, a interação proteína-DNA e o envelhecimento do DNA. Esses conceitos são de grande importância no entendimento do mecanismo de desnaturação enzimática. Entretanto, para que se interprete o significado dessas variáveis em processos enzimáticos, torna-se importante a compreensão de suas definições (QIAN; BEARD, 2005).

A Termodinâmica é a ciência que estuda as trocas de energia que ocorrem entre o sistema e a vizinhança durante uma mudança de estado. Está baseada em quatro generalizações, conhecidas como Princípios ou Leis da Termodinâmica, que governam as transformações de um tipo de energia em outro (OLIVEIRA; DECHOUM, 2003).

A Primeira Lei da Termodinâmica não é transposição da lei da conservação da energia em Física e em Química. A sua formulação matemática traduz que a variação da energia interna de um sistema,  $\Delta U$ , é igual à soma do calor com o trabalho que o sistema troca com a sua vizinhança, ou seja, essa lei estabelece que há um fluxo de energia durante uma mudança de estado, impondo para isso, uma única condição restritiva: a conservação de energia, podendo ser expressa na seguinte Equação (3):

$$\Delta U = Q + W \quad (3)$$

Na Equação (3),  $Q$  e  $W$  assumem valores positivos sempre que correspondem a energia que entra no sistema. Do ponto de vista matemático, a simplicidade da Equação (3) é evidente. Talvez por essa razão, o seu significado físico não seja suficientemente explorado, originando dúvidas, ou mesmo confusões, na sua interpretação e aplicação a situações físico-químicas (ANACLETO; ANACLETO, 2007).

A determinação dos parâmetros termodinâmicos ajuda a entender o mecanismo de desnaturação da enzima, o qual é muito importante em processos enzimáticos, bem como o efeito da temperatura na taxa de desnaturação enzimática. Os parâmetros entalpia ( $\Delta H$ ) e entropia ( $\Delta S$ ) fornecem o número de ligações não covalentes quebradas e a mudança na desordem enzima/solvente associada com a formação do estado de transição, respectivamente (HEIDTMANN et al., 2012).

Entretanto, em relação a uma enzima, a energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de uma enzima é diferente para cada estado: forma nativa e forma desnaturada, e indica quanto da conformação inicial ainda está preservada ou ativa. A desnaturação ocorre quando  $\Delta G$  assume valor baixo, indicando que o estado assumido apresenta menos energia disponível, em função da desnaturação, quando comparado com o estado inicial (HEIDTMANN et al., 2012). Podendo concluir que quando a enzima estiver totalmente desnaturada, a  $\Delta G$  será igual a zero.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Selecionar linhagens de *Aspergillus* spp quanto o seu potencial para a produção de proteases, caracterizá-las bioquimicamente e purificar em Sistemas de Duas Fases Aquosas (PEG/Sal).

#### 3.2. Objetivos Específicos

- Selecionar quantitativamente as linhagens produtoras de proteases;
- Produzir proteases por Fermentação em Estado Sólido utilizando substratos agroindustriais;
- Estudar a influência das variáveis: quantidade de resíduo, umidade e temperatura sobre a produção das proteases por fermentação em estado sólido, utilizando um planejamento fatorial ( $2^3$ );
- Caracterizar bioquimicamente a protease no extrato enzimático, em relação ao pH ótimo, temperatura ótima e estabilidade ao pH;
- Purificação da protease utilizando sistema de duas fases aquosas PEG-Sal;
- Estudar a influência das variáveis (massa molar e concentração do PEG, pH e concentração de fosfato) sobre a extração da protease.

## REFERÊNCIAS

AHMED, I.; ZIA, M. A.; IQBAL, H. M. N. Purification and Kinetic Parameters Characterization of an Alkaline Protease Produced from *Bacillus subtilis* through Submerged Fermentation Technique. **World Applied Sciences Journal**, v. 12, n. 6, p. 751–757, 2011.

ALBERTSON, P.-A. **Partition of Cell Particles and Macromolecules**. 3. ed. Wiley-Interscience, 1986. p. 346

ALBERTSSON, P.-A. **Methods of Biochemical Analysis: Partition Methods for Fractionation of Cell Particles and Macromolecules**. John Wiley & Sons, 1962. p. 399

ANACLETO, J.; ANACLETO, A. Sobre a primeira lei da termodinâmica. As diferenciais do calor e do trabalho. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 488–490, 2007.

ANANDAN, D.; MARMER, W. N.; DUDLEY, R. L. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamaritii*. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 34, n. 5, p. 339–47, maio. 2007.

ANDREWS, B. A.; SCHMIDT, A. S.; ASENJO, J. A. Correlation for the partition behavior of proteins in aqueous two-phase systems: effect of surface hydrophobicity and charge. **Biotechnology and bioengineering**, v. 90, n. 3, p. 380–90, 5 maio. 2005.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein expression and purification**, v. 88, n. 2, p. 214–20, abr. 2013.

ARCHER, D. B.; CONNERTON, I. F.; MACKENZIE, D. A. Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 111, n. February, p. 99–147, jan. 2008.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–35, 9 dez. 2011.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: phase separation and applications. **Journal of chromatography. A**, v. 1238, p. 1–10, 18 maio. 2012.

BARROS, F. F. C. et al. Production of Enzymes from Agroindustrial Wastes by Biosurfactant-Producing Strains of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology research international**, v. 2013, p. 103960, jan. 2013.

BASS, D.; RICHARDS, T. A. Three reasons to re-evaluate fungal diversity “On Earth and in the ocean”. **Fungal Biology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 159–164, dez. 2011.

BEG, Q.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 203–209, 2003.

BENNETT, J. W. An Overview of the Genus. **Molecular Biology and Genomics**, p. 1 – 19, 2010.

BERTI, P. J.; STORER, A. C. Alignment/Phylogeny of the Papain Superfamily of Cysteine Proteases. **J. Mol. Biol.**, v. 246, p. 273–283, 1995.

BHUNIA, B. et al. Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). **International journal of biological macromolecules**, v. 54, p. 1–8, mar. 2013.

BINOD, P.; PALKHIWALA, P. Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India. **Jornal of Scientific & Industrial Research**, v. 72, n. May, p. 271–286, 2013.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5. 1 million species? **American journal of botany**, v. 98, n. 3, p. 426–38, mar. 2011.

CAI, Y. et al. Expression and purification of recombinant Trail protein in *E.coli* and the optimal conditions for Trail purification. **Chinese journal of cellular and molecular immunology**, v. 28, n. 6, p. 596–600, jun. 2012.

CHAKRABARTI, S. K.; MATSUMURA, N.; RANU, R. S. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine Protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6. 2). **Current Microbiology**, v. 40, p. 239–244, 2000.

CHANG, C.; WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 11, p. S37–43, nov. 2001.

CHARLES, P. et al. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of basic microbiology**, v. 48, n. 5, p. 347–52, out. 2008.

CHAUHAN, B.; GUPTA, R. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2115–2122, out. 2004.

CHOI, C. J.; BERGES, J. A. New types of metacaspases in phytoplankton reveal diverse origins of cell death proteases. **Cell death & disease**, v. 4, n. 2, p. e490, jan. 2013.

CHOUDHARY, V.; JAIN, P. C. Optimization of process parameters for alkaline protease production by *Aspergillus versicolor* PF/F/107. **J. Acad. Indus. Res.**, v. 1, n. June, p. 8–14, 2012.

CHUTMANOP, J. et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 7, p. 1012–1018, jul. 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, out. 2006.

CRAIK, C. S.; PAGE, M. J.; MADISON, E. L. Proteases as therapeutics. **The Biochemical journal**, v. 435, n. 1, p. 1–16, 1 abr. 2011.

DE CASTRO, A. M. et al. Multiresponse Optimization of Inoculum Conditions for the Production of Amylases and Proteases by *Aspergillus awamori* in Solid-State Fermentation of Babassu Cake. **Enzyme research**, v. 2011, p. 457392, jan. 2011.

DE PARIS, L. D. et al. Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 34, n. 2, p. 193–200, 7 mar. 2012.

DELABONA, P. D. S. et al. Effect of initial moisture content on two Amazon rainforest *Aspergillus* strains cultivated on agro-industrial residues: Biomass-degrading enzymes production and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 236–242, mar. 2013.

DHANDAPANI, B. et al. Impact of aeration and agitation on metabolic heat and protease secretion of *Aspergillus tamarii* in a real-time biological reaction calorimeter. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1533–42, jun. 2012.

DING, X. et al. Design of functional guanidinium ionic liquid aqueous two-phase systems for the efficient purification of protein. **Analytica chimica acta**, v. 815, p. 22–32, 7 mar. 2014.

DUDHAGARA, P. et al. Isolation, Characterization and investigating the Industrial Applications of Thermostable and Solvent Tolerant Serine Protease from Hot Spring Isolated Thermophilic *Bacillus licheniformis* U1. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 75–82, 25 mar. 2014.

DUTTA, J.; DUTTA, P.; BANERJEE, R. Kinetic study of a low molecular weight protease from newly isolated *Pseudomonas* sp. using artificial neural network. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 4, n. January, p. 127–133, 2005.

FERNANDES DE OLIVEIRA, L. M. et al. Rapid purification of serine proteinases from *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* venoms. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 76, p. 282–90, 15 dez. 2013.

FERREIRA, L. et al. Structural features important for differences in protein partitioning in aqueous dextran-polyethylene glycol two-phase systems of different ionic compositions. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1844, n. 3, p. 694–704, mar. 2014.

FISCHER, R.; ZEKERT, N.; TAKESHITA, N. Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. **Molecular microbiology**, v. 68, n. 4, p. 813–26, maio. 2008.

FONTAN, R. D. C. I. et al. Cinética de inativação da peroxidase em água de coco. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 249–258, 5 abr. 2012.

FUTAI, E. et al. Molecular cloning of PalBH, a mammalian homologue of the *Aspergillus* atypical calpain PalB. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1517, n. 2, p. 316–9, 26 jan. 2001.

GAVASANE, M. R.; GAIKAR, V. G. Aqueous two-phase affinity partitioning of penicillin acylase from *E. coli* in presence of PEG-derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 6, p. 665–675, maio. 2003.

GERMANO, S. et al. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2, p. 246–251, fev. 2003.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14–22, jan. 2013.

GONÇALEZ, E. et al. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 312–317, set. 2013.

GRAYCAR, T. P. Proteolytic Cleavage, Reaction Mechanisms. In: FLINKINGER, M. C.; DREW, S. W. **Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation**. v. 1-5. John Wiley & Sons. 1999. p. 2214-2222.

GRIER, T. J. et al. Allergen stabilities and compatibilities in mixtures of high-protease fungal and insect extracts. **Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology**, v. 108, n. 6, p. 439–47, jun. 2012.

GRIMM, L. H. et al. Morphology and productivity of filamentous fungi. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 69, n. 4, p. 375–84, dez. 2005.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–95, dez. 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, jun. 2002.

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. 915–23, jul. 2008.

HAJJI, M. et al. Gene cloning and expression of a detergent stable alkaline protease from *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1746–1752, out. 2010.

HAKI, G. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17–34, ago. 2003.

HAMIDI-ESFAHANI, Z.; SHOJAOSADATI, S. A.; RINZEMA, A. Modelling of simultaneous effect of moisture and temperature on *A. niger* growth in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 265–272, nov. 2004.

HATTI-KAUL, R. Aqueous two-phase systems. **Molecular biotechnology**, v. 19, p. 1 – 20, 2001.

HEIDTMANN, R. B. et al. Caracterização cinética e termodinâmica de  $\beta$ -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 1, p. 41–49, 2012.

HERCULANO, P. N. et al. Cellulase production by *Aspergillus japonicus* URM5620 using waste from castor bean (*Ricinus communis* L.) under solid-state fermentation. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 165, n. 3-4, p. 1057–67, out. 2011.

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.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, jun. 2005.

HÖRGER, A. C.; VAN DER HOORN, R. A. L. The structural basis of specific protease-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. **Current opinion in structural biology**, v. 23, n. 6, p. 842–50, dez. 2013.

HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. **Mycologia**, v. 105, n. 4, p. 912–37, 2013.

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.

IQBAL, H. M. N.; AHMED, I.; KHAN, M. A. Partial Characterization of Purified Protease Produced from *Rhizopus oligosporus* Using a by-products of Oil Industry. **World Applied Sciences Journal**, v. 13, n. 3, p. 600–605, 2011.

IRE, F.; OKOLO, B.; MONEKE, A. Purification and characterization of an acid protease from *Aspergillus carbonarius*. **African Journal of Food Sciences**, v. 5, n. 12, p. 695–709, 2011.

JAIN, R.; AGRAWAL, S.; JAIN, P. Proteolytic actinomycetes from Indian habitats. **Jornal of Culture Collections**, v. 6, p. 28–37, 2013.

JEDD, G. Fungal evo-devo: organelles and multicellular complexity. **Trends in cell biology**, v. 21, n. 1, p. 12–9, jan. 2011.

JERONIMO, C. E. DE M.; CAMACHO, F.; COELHO, M. S. Impacts caused by the inadequate deposition of the residue of the Rio Grande do Norte agroindustries. **Revista de Ciências**. v. 6, n. 2, p. 49–60, 2013.

JOHANSSON, H.-O. et al. Protein partitioning in poly(ethylene glycol)/sodium polyacrylate aqueous two-phase systems. **Journal of chromatography. A**, v. 1178, n. 1-2, p. 145–53, 18 jan. 2008.

JOO, H.-S.; CHANG, C.-S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263–1270, mar. 2005.

KARTHIC, J. et al. Research article an approach on isolation, screening and production of protease from *Aspergillus oryzae*. **Jornal of Drug Delivery & Therapeutics**, v. 4, n. 2, p. 86–89, 2014.

KEMPKEN, F.; ROHLFS, M. Fungal secondary metabolite biosynthesis – a chemical defence strategy against antagonistic animals? **Fungal Ecology**, v. 3, n. 3, p. 107–114, ago. 2010.

KIM, J. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Protease from *Aspergillus niger* C-15. **Mycobiology**, v. 32, n. 2, p. 74–78, 2004.

KIM, J.; SUDBERY, P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 49, n. 2, p. 171–7, abr. 2011.

KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345–351, ago. 2002.

KRANTHI, V. S.; RAO, D. M.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. **International Journal of Microbiological**, v. 1, n. 1, p. 12–15, 2012.

LEE, S.-K. et al. Purification and characterization of *Aspergillus oryzae* LK-101 salt-tolerant acid protease isolated from soybean paste. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 327–334, 30 abr. 2010.

LEW, R. R. How does a hypha grow? The biophysics of pressurized growth in fungi. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 509–18, jul. 2011.

LI, C. et al. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. **European Food Research and Technology**, 6 fev. 2014.

LI, Y. et al. The Threonine Protease Activity of Testes-Specific Protease 50 (TSP50) Is Essential for Its Function in Cell Proliferation. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–14, 2012.

LI, Z. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1336–1346, dez. 2010.

LLORENTE, B. E. et al. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. **Food Chemistry**, v. 159, p. 55–63, set. 2014.

LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 6, p. 258–265, jun. 1985.

LOW, D.; O'LEARY, R.; PUJAR, N. S. Future of antibody purification. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 848, n. 1, p. 48–63, 15 mar. 2007.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1729–35, abr. 2008.

MARKARYAN, A. et al. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 6, p. 2149–2157, 1 jun. 1994.

MARKELY, L. R. A. et al. High-throughput ion exchange purification of positively charged recombinant protein in the presence of negatively charged dextran sulfate. **Biotechnology progress**, v. 30, n. 2, p. 516–20, mar. 2014.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 365–73, 2011.

MITCHELL, D.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. **Biochemical engineering aspects of solid state bioprocessing**. Springer Berlin Heidelberg, 2000. v. 68p. 61–138

MOFFITT, K. L.; MARTIN, S. L.; WALKER, B. Proteases implicated in apoptosis: old and new. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, n. 5, p. 563–76, maio. 2010.

MOKHTARANI, B. et al. Partitioning of Ciprofloxacin in aqueous two-phase system of poly(ethylene glycol) and sodium sulphate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 2, p. 241–247, fev. 2008.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista Processos Químicos**, p. 9–23, 2009.

MORYA, V. K. et al. In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, n. 1, p. 243–57, jan. 2012.

MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p. 1–5, 18 jan. 2007.

MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S. K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 353–361, abr. 2008.

NEELAKANTAN, S.; MOHANTY, A. K.; KAUSHIK, J. K. Production and use of microbial enzymes for dairy processing. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 143 – 148, 1999.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters to enhance production of amylase and protease from *Aspergillus awamori* in a single fermentation. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 3, p. 73–80, 8 mar. 2010.

NEJAD, Z. G. 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, p. 1–6, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, M. L. C. et al. Partition and recovery of phytase from *Absidia blakesleeana* URM5604 using PEG–citrate aqueous two-phase systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 318, p. 34–39, mar. 2012.

NIGAM, P. Microbial Enzymes with Special Characteristics for Biotechnological Applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597–611, 23 ago. 2013.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. **Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009.

ODUM, Eugene P. *Odum/Ecologia*. 1<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan. 434p. 2012

OLIVEIRA, P. M. C. DE; DECHOUM, K. Facilitando a Compreensão da Segunda Lei da Termodinâmica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 25, n. 4, p. 359–363, 2003.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de Interesse Industrial - Revisão de Literatura. **Rev. Saúde e Biol.**, v. 7, n. 3, p. 97–109, 2012.

OYELEKE, S. B.; EGWIM, E. C.; AUTA, S. H. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 2, n. 7, p. 83–87, 2010.

PADILHA, G. S. et al. Avaliação da lipase extracelular de *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 16–22, 2011.

PADMAPRIYA, B. et al. Production and Purification of Alkaline Serine Protease from Marine *Bacillus* Species and Its Application in Detergent Industry. v. 4, n. 1, p. 21–26, 2012.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 65, n. 7-8, p. 1220–36, abr. 2008.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, ago. 2000.

PANDEY, A. et al. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications. **Bioresource technology**, v. 82, n. 305, p. 8524, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, jul. 2000.

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences** 5, v. 5, n. 3, p. 308–312, 2009.

PEI, Y. et al. Ionic liquid-based aqueous two-phase extraction of selected proteins. **Separation and Purification Technology**, v. 64, n. 3, p. 288–295, jan. 2009.

PERICIN, D. M.; MADAREV-POPOVIĆ, S. Z.; RADULOVIĆ-POPOVIĆ, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two-phase systems using response surface methodology. **Biotechnology letters**, v. 31, n. 1, p. 43–7, jan. 2009.

PINA, A. S.; BATALHA, I. L.; ROQUE, A. C. A. Affinity tags in protein purification and peptide enrichment: an overview. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1129, p. 147–68, jan. 2014.

PORTO, C. S. et al. Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 2, p. 165–171, jan. 2011.

PORTO, T. S. et al. Liquid–liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 47, n. 4, p. 716–721, abr. 2008.

QIAN, H.; BEARD, D. A. Thermodynamics of stoichiometric biochemical networks in living systems far from equilibrium. **Biophysical chemistry**, v. 114, n. 2-3, p. 213–20, 22 maio. 2005.

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.

RAJMALWAR, S.; DABHOLKAR, P. Production of protease by *Aspergillus* sp. using solid-state fermentation. **African Journal of ...**, v. 8, n. 17, p. 4197–4198, 2009.

RAJU, E. V. N.; DIVAKAR, G. An Overview on microbial fibrinolytic proteases. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 3, p. 643–656, 2014.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N. D. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 183–228, 1995.

RAWLINGS, N. D. **Protease Families, Evolution and Mechanism of Action**. Vienna: Springer Vienna, , 2013. (Nota técnica).

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D227–33, jan. 2010.

RESCHKE, T.; BRANDENBUSCH, C.; SADOWSKI, G. Modeling aqueous two-phase systems: I. Polyethylene glycol and inorganic salts as ATPS former. **Fluid Phase Equilibria**, v. 368, p. 91–103, abr. 2014.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 22, n. 3, p. 211–219, fev. 2005.

ROHLFS, M. et al. Secondary chemicals protect mould from fungivory. **Biology letters**, v. 3, n. 5, p. 523–5, 22 out. 2007.

ROSA, P. A. J. et al. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 6, p. 559–67, jan. 2011.

ROSSO, B. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly (ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase ...**, v. 335, p. 20–25, 2012.

SABU, A et al. Tamarind seed powder and palm kernel cake: two novel agro residues for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* ATCC 16620. **Bioresource technology**, v. 96, n. 11, p. 1223–8, jul. 2005.

SAJEED ALI, S.; VIDHALE, N. N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid-State Fermentation Using Rice Bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p. 45–47, 5 maio. 2013.

SALES, A. E. et al. Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1676–88, ago. 2013.

SALMON, D. N. X. et al. Aqueous two-phase extraction for partial purification of *Schizophyllum commune* phytase produced under solid-state fermentation. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 32, n. 1, p. 45–52, 22 jan. 2014.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, jul. 2005.

SANKEERTHANA, C.; PINJAR, S.; JAMBAGI, R. Production and Partial Characterization of Protease from *Aspergillus flavus* using Rice Mill Waste as a Substrate and its Comparison with *Aspergillus Niger*. **International Journal of Current Engineering and Technology**, p. 143 – 147, 2013.

SECOR, E. R. et al. Bromelain exerts anti-inflammatory effects in an ovalbumin-induced murine model of allergic airway disease. **Cellular immunology**, v. 237, n. 1, p. 68–75, set. 2005.

SEEMÜLLER, E. et al. Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5210, p. 579–82, 28 abr. 1995.

SHAHINA, Z.; HOSSAIN, M.; HAKIM, M. Characterization of protease producing fungi *Aspergillus funiculosus* and *A. tamarii*, and their proteases. **Chittagong University Journal of ...**, v. 4, p. 91–98, 2013.

SHANG, Q. . et al. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. **Fluid Phase Equilibria**, v. 219, n. 2, p. 195–203, maio. 2004.

SHARMA, S. et al. Potentiality of Earthworms for Waste Management and in Other Uses – A Review. v. 1, n. 1, p. 4–16, 2005.

SHIEH, C.-J.; PHAN THI, L.-A.; SHIH, I.-L. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, n. 1, p. 85–91, jan. 2009.

SHIKHA; SHARAN, A.; DARMWAL, N. S. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresource technology**, v. 98, n. 4, p. 881–5, mar. 2007.

SHIRASAKA, N. et al. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. **Mycoscience**, v. 53, n. 5, p. 354–364, 24 jan. 2012.

SIALA, R. et al. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II : purification and characterization. **African Journal os Biotechonology**, v. 8, n. 18, p. 4582–4589, 2009.

SILVA, L. DA; LOH, W. Sistemas aquosos bifásicos: fundamentos e aplicações para partição/purificação de proteínas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1345–1351, 2006.

SILVESTRE, M. P. C. et al. Ação da protease do *Aspergillus sojae* e da pancreatina na hidrólise do concentrado proteico de soro de leite. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 3, p. 19–27, 2012.

SINGH, P.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**, p. 13–33, 2009.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, abr. 2009.

SIQUEIRA, A. J. S. et al. Determinação do Km e V Max : revisão e uma nova proposta. **Ciência em Movimento**, v. 27, n. Ano XIII, p. 1 – 6, 2011.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances : a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480–486, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553–1558, jun. 2003.

UPADHYAY, M. K. et al. Optimization and characterization of an extracellular proteases from *Aspergillus flavus* ” MTCC 277 ”. v. 5, n. 14, p. 1845–1850, 2010.

VICCINI, G.; MITCHELL, D.; BOIT, S. Analysis of growth kinetic profiles in solid-state fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 271–294, 2001.

VISHWANATHA, K.; APPURAO, A; SINGH, S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402–407, 15 maio. 2009.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A G. A.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129–38, fev. 2010.

WIŚNIEWSKI, J. R.; MANN, M. Consecutive proteolytic digestion in an enzyme reactor increases depth of proteomic and phosphoproteomic analysis. **Analytical chemistry**, v. 84, n. 6, p. 2631–7, 20 mar. 2012.

XU, D. et al. Characterisation of acid proteases from a fusant F76 and its progenitors *Aspergillus oryzae* HN3042 and *Aspergillus niger* CICC2377. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 4, p. 678–684, 11 abr. 2013.

XU, H.; JOHNSTON, S. Yeast bleomycin hydrolase is a DNA-binding cysteine protease. Identification, purification, biochemical characterization. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 33, p. 21177–21183, 19 ago. 1994.

YADAV, S. K.; BISHT, D.; DARMWAL, N. S. Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. **african Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 43, p. 8630–8640, 2011.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 23 jan. 2011.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Journal of microbiology (Seoul, Korea)**, v. 48, n. 3, p. 331–6, jun. 2010.

ZASLAVSKY, B. Y. Bioanalytical Applications of Partitioning in Aqueous Polymer Two-Phase Systems. **Analytical Chemistry**, v. 64, n. 15, p. 765A–773A, 31 ago. 1992.

ZHAN, D. et al. Theoretical study on the allosteric regulation of an oligomeric protease from *Pyrococcus horikoshii* by Cl<sup>-</sup> Ion. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 2, p. 1828–42, jan. 2014.

## CAPÍTULO II

### **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE EXTRACELULAR DE *Aspergillus tamaraii* URM4634 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE EXTRACELULAR DE  
*Aspergillus tamaritii* URM4634 EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO**

Osmar Soares da Silva<sup>a</sup>, Rodrigo Lira de Oliveira<sup>b</sup>, Cristina Maria Souza-Motta<sup>c</sup>,  
Ana Lúcia Figueiredo Porto<sup>a</sup>, Tatiana Souza Porto<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Morfologia e Fisiologia. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos – CEP: 52171-900, Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup> Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista – CEP: 55296-901, Garanhuns, PE, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Micologia. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

\*Autor para Correspondência: Tel.: +55 87 96006945. Endereço de e-mail: [portots@yahoo.com.br](mailto:portots@yahoo.com.br) (T.S. Porto)

## RESUMO

*Aspergillus tamarii* é um fungo filamentosos usado na produção de proteases em processos fermentativos. As proteases microbianas são exploradas devido produzir uma quantidade substancial de enzimas para fins industriais. Neste estudo foi avaliado o potencial de produção e caracterização de proteases produzidas por *Aspergillus tamarii* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido. O líquido metabólico do *A. tamarii* URM4634 apresentou atividade máxima de 401,42 U/mL. Este valor foi alcançado utilizando 5g de farelo de trigo, 40% de umidade em 72 horas de cultivo à 30°C. A protease no extrato bruto exibiu uma cinética de Michaelis-Mentem com  $K_m = 18,7$  mg/mL e  $V_{max} = 28,5$  mg/mL/min utilizando azocaseína como substrato. A temperatura ótima da atividade proteolítica foi a 40°C e manteve a sua atividade residual em 90% durante 180 minutos. O pH ótimo da enzima foi de 8,0, apresentando 97,24% de estabilidade em pH 8,0 em 24 horas. A atividade proteolítica residual apresentou maior inibição pelo íon  $Cu^{2+}$  (66,02%), seguido pelo íon de  $Hg^{2+}$  (77,31%) e não sofreu inibição pelos íons  $K^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  em concentração de 5mM. A enzima foi inibida pelo PMSF e EDTA em 65,11% e 28,85%, respectivamente, indicando que a enzima é uma Serino Protease. Estas propriedades fazem da protease de *A. tamarii* URM4634 uma enzima adequada para aplicação na indústria de detergente e alimentos e outras aplicações biotecnológicas.

**Palavras-chave:** *Aspergillus tamarii*. Protease. Caracterização Bioquímica. Fermentação em Estado Sólido.

## 1. INTRODUÇÃO

A procura de proteases, particularmente aquelas de origem microbiana, está aumentando devido à sua aplicação nas indústrias de biotecnologia, biomedicina, medicina, alimentos e farmacêutica [1,2]. As proteases são as enzimas mais importantes para aplicações biotecnológicas, o que corresponde, aproximadamente, 65% de todas as enzimas comercializadas em todo o mundo [3,4] e entre estas enzimas as proteases alcalinas se destacam por possuir um amplo potencial biotecnológico para aplicações nos setores industriais como detergentes para a roupa, processamento de couro, fabricação de cerveja, alimentos e indústrias farmacêuticas [1].

Os fungos filamentosos, como *Aspergillus*, são explorados para a produção de enzimas industriais, devido à sua capacidade de crescer em substratos sólidos ou líquidos e possuir uma ampla produção de enzimas extracelulares. Dentre as vantagens da produção de enzimas por fungos, o seu baixo custo, a alta produtividade, a produção rápida, e a facilidade com que as enzimas podem ser modificadas são as causas pela escolha desses micro-organismos [5]. Embora a produção de proteases é uma propriedade inerente de todos os organismos, apenas os micro-organismos são capazes de produzir com uma quantidade substancial de proteases extracelulares para exploração comercial [6]. Altos rendimentos são obtidos em Fermentação em Estado Sólido.

Fermentação em Estado Sólido (FES) foi escolhida para a presente estudo devido apresentar uma produtividade enzimática mais relatada na literatura do que a Fermentação Submersa [7]. Economicamente, FES oferece muitas vantagens, incluindo uma produtividade superior volumétrica, uso de equipamentos mais simples, a utilização de substratos de baixo custo, processamento downstream mais simples e as exigências de energia mais baixos quando comparados com fermentação submersa [7,8].

Devido à grande aplicação comercial de protease é necessário estudar a caracterização cinética desta enzima, a fim de melhorar a compreensão das reações enzimáticas. As enzimas são catalisadores naturais que aceleram as reações químicas. No entanto, a velocidade de qualquer reação sendo catalisada por uma enzima particular só pode atingir determinado valor máximo. Parâmetros como velocidade máxima da reação ( $V_{max}$ ) e constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) são determinados verificando a eficiência dessa enzima e a forma de como é regulada. O estudo cinético da enzima é a informação sobre a ativação e inativação de enzimas bem como o estudo de como ocorre a velocidade no processo catalítico. Os parâmetros cinéticos que controlam a velocidade de uma reação catalisada por enzimas são as seguintes: O tempo de

incubação; a concentração inicial de substrato; a concentração inicial de enzima; pH; e a temperatura de reação [9].

O objetivo deste estudo foi produzir e caracterizar bioquimicamente, determinando os parâmetros cinéticos de protease extracelular produzida por *Aspergillus tamaraii* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismos e inoculação**

O micro-organismo *Aspergillus tamaraii* URM4634 foi obtido a partir da coleção de culturas da micoteca URM, Departamento de Micologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco e mantidos em tubos de ensaios inclinados, contendo o meio Czapek Dox Agar e repicados para a manutenção a cada 28 dias.

*A. tamaraii* URM4634 foi repicado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, contendo meio de cultura Czapek, incubados a 30°C em estufa por 7 dias até ocorrer a esporulação. Os conidiósporos foram coletados com a adição de 10 mL de solução de NaCl (0,9% p/v) e Tween 80 (0,01% v/v). A suspensão de esporos foi normalizada para uma concentração final de  $10^7$  esporos/mL, em uma câmara de contagem de Neubauer.

### **2.2. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido**

O substrato utilizado para a fermentação em estado sólido (FES) foi obtido no mercado local. Este resíduo foi padronizado com um tamanho de partícula entre 0,5 - 2,0 mm e seco a 65°C em estufa, em seguida, armazenados em recipientes hermeticamente fechados. Portanto, os esporos foram inoculados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 5 g de farelo de trigo, autoclavado a 121 °C por 20 minutos, com um teor de 40% de umidade. A fermentação em estado sólido foi concluída após 72 horas a 30°C em câmara climática para produção de proteases. Após a fermentação o extrato proteolítico foi obtido por adição de 7,5 mL de fosfato de sódio 0,1M pH 7,0 por grama de material fermentado e homogeneizado na mesa agitadora por 2 horas, para extrair a enzima. Em seguida a mistura foi macerada durante 1 minuto, seguido

por filtração. Os sólidos do filtrado foram removidos por centrifugação a 5000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado para ensaio analítico.

### 2.3. Planejamento Fatorial 2<sup>3</sup> para produção de proteases

Os experimentos para a produção proteases foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, mostrado na Tabela 1, para avaliar as influências das variáveis: quantidade de substrato, umidade e temperatura, para determinação das condições de cultivo para a produção de protease por FES. O delineamento experimental foi de 8 ensaios e 4 repetições no ponto central. A análise estatística foi realizada com o software Statistica 8.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA) [25].

**Tabela 1.** Níveis das variáveis independentes do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para produção de proteases de *Aspergillus tamarii* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.

Variáveis	Níveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Substrato (g)	3	5	7
Umidade (% m/v)	30	40	50
Temperatura (°C)	25	30	35

### 2.4. Determinação da Atividade proteolítica

A atividade de protease foi determinada pelo método Ginther [10], usando Azocaseína 1% (p/v) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), solubilizada em tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,2, a temperatura ambiente, contendo CaCl<sub>2</sub> 10 mM. A reação consistiu em 0,15 mL de extrato da enzima e 0,25 mL de Azocaseína 1% (p/v), incubada por 1 hora à 25°C. Após este período, a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) - TCA. As amostras foram centrifugadas 3.000 x g por 20 minutos e 0,8 mL do sobrenadante foi adicionado a 0,2 mL de NaOH 1,8 N. Uma unidade de enzima proteolítica foi definida como a quantidade de enzima para produzir um aumento na absorvância de 0,1 em 1 h a 420nm.

## 2.5. Caracterização do Extrato Bruto

### 2.5.1. Determinação dos parâmetros cinéticos ( $K_m$ , $V_{max}$ )

O teste dos parâmetros cinéticos da protease foi determinado de acordo com a seção 2.6, utilizando diferentes concentrações de azocaseína ( $2 < S_0 < 100$  mg/mL). Todos os testes foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como valores médios. A análise estatística foi feita utilizando desvios-padrão dos dados experimentais a partir dos valores médios.

Foram determinados  $K_m$  e  $V_{max}$  através da equação (2) duplo-recíproco de Lineweaver-Burk [11] a partir da velocidade de reação e concentração de substrato.

Equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

Tomando o recíproco:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{max} [S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (2)$$

### 2.5.2. Efeito do pH e estabilidade na atividade enzimática

O pH ótimo para a atividade da protease foi determinada utilizando diferentes tampões a 0,2 M de citrato-fosfato (pH 5,0 - 7,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 8,5); e glicina-NaOH (pH 8,5-11,0) e incubou-se 25° C por 60 minutos. A determinação da atividade da protease foi realizada como descrito na seção 2.6. A estabilidade do pH foi verificada submetendo a enzima aos tampões descritos acima e incubou-se a 5°C. Alíquotas foram retiradas para determinar a atividade proteásica residual em intervalos de tempo 0, 4h, 8h e 24h.

### 2.5.3. Efeito da temperatura e estabilidade na atividade enzimática

O efeito da temperatura foi determinada através da realização da atividade proteásica em temperaturas que variaram de 5 a 90°C. A estabilidade temperatura foi medida mantendo o extrato enzimático na ausência de substrato a temperaturas de 5°C a 90°C, onde foram retiradas alíquotas para determinação da atividade residual em diferentes tempos (0, 60, 120 e 180 minutos) e rapidamente arrefecidos a 25°C, para assegurar a re-enovelamento eficiente das moléculas da enzima, eventualmente inativada reversivelmente.

#### **2.5.4. Efeitos de íons metálicos na atividade proteolítica**

A atividade proteásica foi avaliada na presença de íons, pois estes foram os íons de metais descritos na literatura como inibidores ou ativadores de atividade. O efeito de soluções iônicas foi avaliado nas concentrações de 5 mM e 10 mM. Foram utilizados os seguintes íons: sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Sulfato de magnésio ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), Sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ), cloreto de mercúrio ( $\text{HgCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), cloreto de potássio (KCl) e cloreto de sódio (NaCl) e incubados a 28 °C durante 30 minutos. Os íons foram dissolvidos em Tris-HCl 0,2M pH 7,2. A atividade de protease foi determinada pelo método descrito na seção 2.6.

#### **2.5.5. Efeitos de inibidores na atividade proteolítica**

Para avaliar o efeito dos inibidores sobre a atividade da enzima, o extrato bruto foi exposto aos seguintes inibidores de protease: PMSF (10 mM), 2-mercaptoetanol (10 mM), EDTA (10 mM), pepstatina A (1  $\mu\text{M}$ ) e ácido iodoacético (10 mM) e foram realizadas à 25°C por 30 minutos. A atividade da solução de enzima sem inibidor foi considerada como controle (100%) e a metodologia para a determinação da atividade proteolítica foi determinada pelo método descrito no item 2.6.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1. Produção de proteases por Fermentação em Estado Sólido

Para avaliação da produção de proteases em FES foram realizados ensaios com base em um planejamento fatorial completo  $2^3$  e os resultados das variáveis: substrato (g), umidade (%) e temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), estão representados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Resultados do planejamento fatorial completo  $2^3$  para a produção de proteases em Fermentação em Estado Sólido.

Ensaio	Substrato (g)	Umidade (%)	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	AP* (U/mL)
1	3	30	25	353,83
2	7	30	25	337,00
3	3	50	25	353,67
4	7	50	25	383,17
5	3	30	35	312,50
6	7	30	35	235,17
7	3	50	35	251,17
8	7	50	35	263,67
9 (C)	5	40	30	399,17
10(C)	5	40	30	404,67
11(C)	5	40	30	397,67
12(C)	5	40	30	404,17

\*AP – Atividade Proteásica; (C) – Pontos centrais.

Em todos os experimentos do planejamento fatorial a enzima produzida por *A. tamaritii* URM4634 apresentou atividade proteásica. O melhor valor alcançado da atividade foi 401,42 U/mL, obtidos a partir da média dos resultados dos pontos centrais (5g de farelo de trigo, 40% de umidade à  $30^{\circ}\text{C}$ ) após 72 horas de incubação. Mostrando que a Fermentação em Estado Sólido é eficaz na produção de proteases por *A. tamaritii* URM4634.

**Tabela 3.** Efeito calculado das respostas do planejamento fatorial completo  $2^3$  para a produção de protease de *Aspergillus tamaraii* URM4634 em Fermentação em Estado Sólido.

Variáveis independentes	Atividade Proteásica (U/mL)
(1) Substrato	-0,78
(2) Umidade	0,19
(3) Temperatura	-5,52*
1 x 2	2,06
1 x 3	-1,17
2 x 3	-1,19
1 x 2 x 3	0,65

\*Dados estatisticamente significativos a 95% de confiança ( $p < 0,05$ )

A análise dos efeitos das variáveis independentes (Tabela 3) mostra que apenas uma variável apresenta efeito estatisticamente significativo, pois o valor de efeito estimado está acima do nível de significância ( $p < 0,05$ ). Desta forma, a variável por estar acima do nível de significância estatística está contribuindo (positivamente ou negativamente) para o aumento da produção de protease de *A. tamaraii* URM4634.

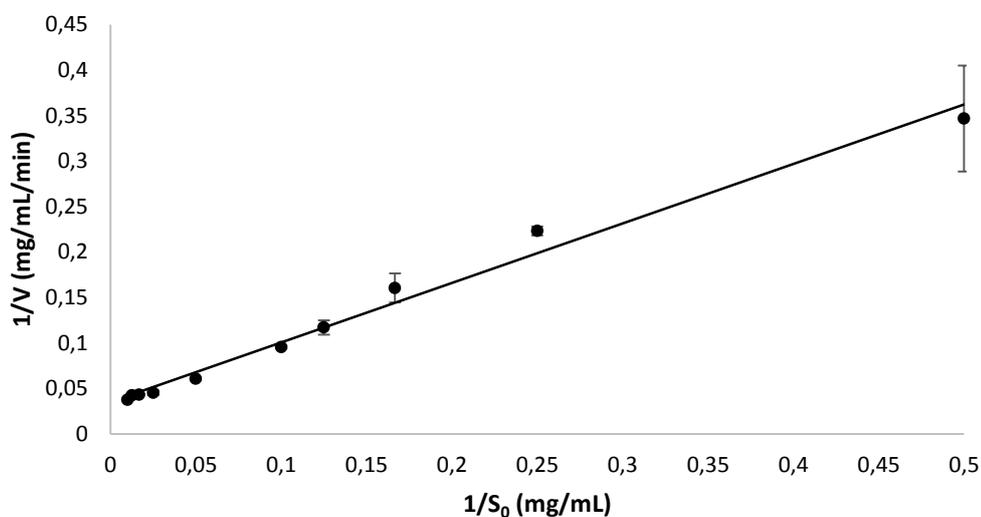
Para a atividade proteásica (U/mL), a variável que apresentou maior influência sobre a produção da enzima foi a temperatura, com efeito negativo, a partir de 72 horas de cultivo, indicando que com a diminuição da temperatura houve um aumento na produção de protease de *A. tamaraii* URM4634.

As melhores condições para a produção de protease extracelular de *Aspergillus tamaraii* URM4634 foram obtidas nos ensaios correspondentes ao ponto central, ou seja, 5g de farelo de trigo, 40% de umidade e 30°C. Resultados semelhantes foi obtido por Anandan, Marmer e Dudley [12] que ao estudar o efeito das variáveis: substrato, umidade e temperatura, para a produção de uma protease alcalina de *Aspergillus tamaraii*, obteve as melhores atividades proteásica nos ensaios contendo 5g de farelo de trigo, 60% de umidade e 30°C.

A quantidade de substrato e umidade não apresentaram efeito para a produção de proteases por *Brevibacterium linens* DSM 20158 [13]. Os melhores valores obtidos no estudo foram a 30°C. Semelhantemente aos resultados obtidos no presente trabalho, o qual a temperatura a 30°C foi responsável pelos maiores valores de atividade.

### 3.2. Parâmetros cinéticos da protease

Figura 1. mostra o gráfico de Lineweaver – Burk da velocidade inicial da protease extracelular de *A. tamaritii* URM4634 em função da concentração inicial de substrato. Os valores de  $K_m$  e  $V_{max}$  foram de 18,7mg/mL e 28,57mg/mL/min, respectivamente.  $K_m$  foi relacionado como a afinidade da enzima para com substrato azocaseína, e sabe-se que, quanto menor o valor do  $K_m$  maior a afinidade da enzima pelo substrato. A protease produzida por *A. tamaritii* URM4634 apresentou um valor de  $K_m$  próximo ao encontrado para uma protease extracelular produzida por *Pseudomonas aeruginosa* ( $K_m = 18,18$  mg/mL) [14]. Resultado diferente da cinética de uma serino protease alcalina recombinante de *Escherichia coli* DH10B utilizando o mesmo substrato, em diferentes concentrações (0,1 - 10mg/mL), mostraram um  $K_m = 0,13$ mg/mL [15]. A caracterização dos parâmetros cinéticos de uma protease alcalina produzidas por *Penicillium nalgiovense* apresentou  $K_m$  e  $V_{max}$  de 1.152mg/mL e 0.827mg/mL/min, respectivamente [16].



**Figura 1.** Curva duplo recíproco de Lineweaver-Burke da protease extracelular utilizando azocaseína como substrato ( $R^2 = 0,99$ ).

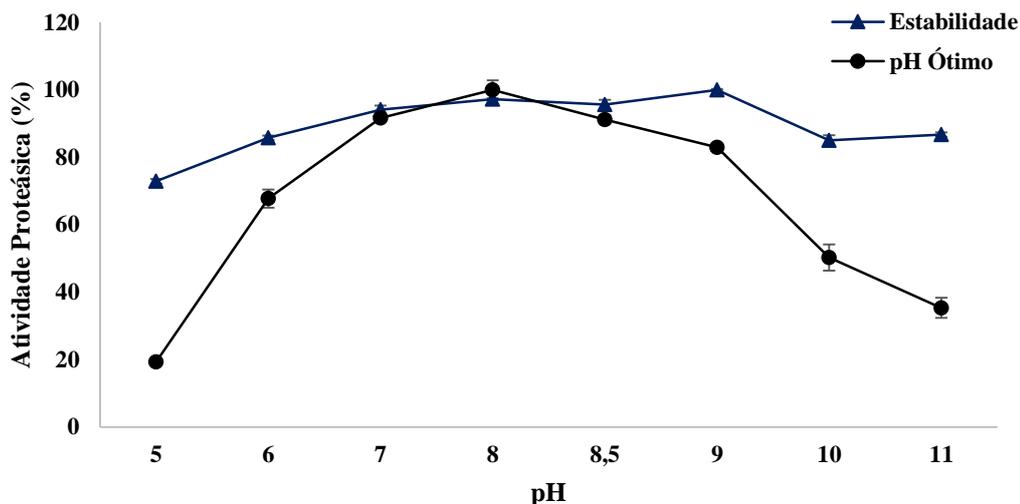
A protease produzida por *Aspergillus tamaritii* URM4634 mostrou um valor elevado para o  $K_m$  em relação às encontradas na literatura. O alto valor de  $K_m$  da protease alcalina de *A. tamaritii* URM4634 pode ser a presença de inibidores ou mais de uma enzima no extrato bruto, o que causou uma diminuição da afinidade da protease com a azocaseína.

### 3.3. pH ótimo e estabilidade da protease

O resultado sobre o efeito do pH e a estabilidade da enzima pode ser observado na Figura 2. O pH ótimo da protease obtida pela FES foi detectada em pH 8,0 com 417,67 U/mL na presença de Tris-HCl 0,2M. A enzima manteve 91,66% e 91,18% da sua atividade relativa ao pH 7,0 e 8,5, também em Tris-HCl 0,2M. A protease manteve sua atividade de 82,88% e 50,28% no tampão NaOH-Glicina 0,2M pH de 9,0 e 10,0, respectivamente. Em pH ácido (5,0) a enzima apresentou 19,23% em presença de tampão Citrato-fosfato 0,2M. Os resultados mostram que a protease foi estável ao longo de uma faixa de pH, porém abaixo de pH 6,0 ou acima de pH 10,0, a sua atividade diminuiu abruptamente. A enzima foi caracterizada como protease alcalina, uma vez que mantém a sua atividade quando testados na faixa alcalina (pH 8,0-10,0).

O mesmo pH ótimo (8,0) foi encontrado para protease alcalina de *Aspergillus nidulans* HA-10, utilizando meio sintético para o crescimento do microrganismo [17]. Pesquisa semelhante com o fungo termofílico *Myceliophthora* sp, apresentou pH ótimo de 9,0 e 1,78 U/mL de protease, quando cultivada em FES. Por outro lado, o mesmo microrganismo cultivado em fermentação submersa teve o seu pH ótimo de 7,0 e 0,38 U/mL de atividade de proteásica [1], o que sugere uma expressão de protease diferente em ambas técnicas de fermentação.

A estabilidade ao pH da enzima é importante para a caracterização enzimática, antes de serem comercializadas. A protease produzida por *Aspergillus tamaris* URM4634 foi estável a todos os valores de pH testados, atingindo 24 horas de ensaio com uma atividade residual superior a 70% em pH 5,0 e 86,72% em pH 11,0. Esta estabilidade da protease de *A. tamaris* URM4634 ao pH demonstrou potencial para possíveis aplicações industriais, por apresentarem propriedades alcalinas que podem ser empregadas na indústria de couro, detergentes e farmacêuticos [1]. Resultados semelhantes foram relatados para proteases alcalinas de *Aspergillus niger* (pH 8,0) [18], *Aspergillus niger* (pH 8,5) [19] e *Aspergillus parasiticus* (pH 8,0) [20] os quais apresentaram estabilidade ao pH na faixa de (6,0-12,0), corroborando com os dados desse trabalho.

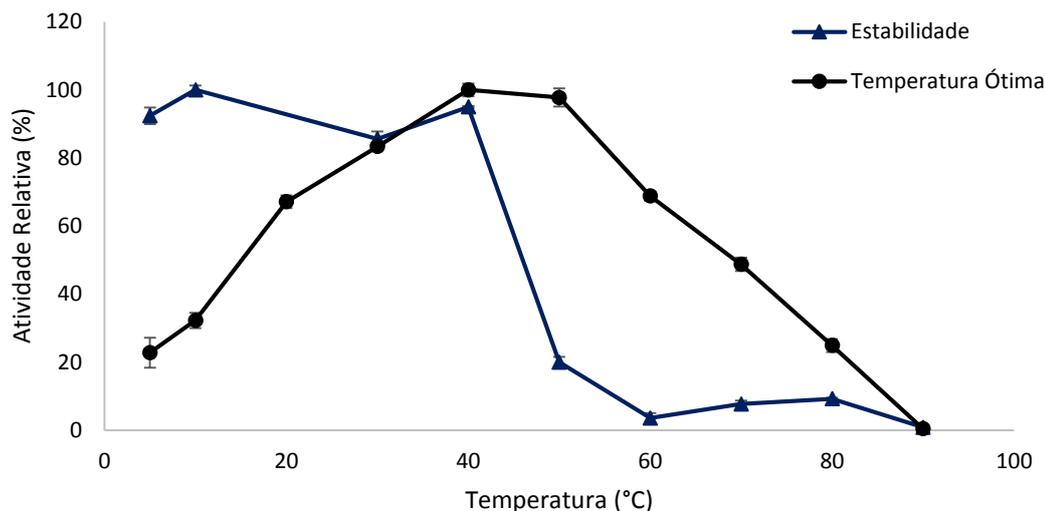


**Figura 2.** Curva de pH ótimo e estabilidade da protease produzida por *Aspergillus tamaraii* URM4634 em diferentes tampões por 24 horas de reação.

### 3.4. Temperatura ótima e estabilidade da protease

A temperatura ótima da protease foi de 40°C, como pode ser visto na Figura 3. À 25°C, a enzima mostrou atividade relativa de 78,25%, reduzindo a atividade 24,93% a 80°C. A atividade foi completamente perdida quando exposta a 90 °C.

Yadav, Bisht, Darmwal [21] encontrou a mesma temperatura ótima para caracterização da protease alcalina de *Aspergillus flavus*. Semelhantemente os resultados obtidos neste trabalho, outros autores reportaram temperatura ótima para caracterização das proteases de *Aspergillus flavus*, utilizando diferentes sementes oleaginosas como substrato [22]. No entanto, uma temperatura ótima de 60°C, foi reportada na caracterização de protease de *Aspergillus fumigatus* [23]. De acordo com o estudo, a protease mostrou 60% de atividade residual em 64°C. A protease produzida por *Aspergillus tamaraii* URM4634 apresentou mais de 68% de atividade residual quando comparada com a mesma temperatura descrita por Martínez-Hernández et al. [23]. A enzima manteve-se estável à temperatura ambiente (25°C), mantendo-se a atividade residual superior a 94% a 40°C e 20% a 50 °C, respectivamente, em 180 minutos de ensaio.



**Figura 3.** Curva de temperatura ótima e estabilidade da protease produzida por *Aspergillus tamaris* URM4634 em diferentes temperaturas por 180 minutos de reação.

### 3.5. Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica

Os efeitos dos íons metálicos na atividade de protease foram resumidos na Tabela 4. A atividade da enzima não foi afetada pelos íons  $K^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  na concentração de 5 mM. Além disso, a atividade da enzima foi estimulada na presença de  $Mg^{2+}$  (10mM). A enzima é inibida pelos íons de  $Hg^{2+}$  (22,69%) e  $Cu^{2+}$  (33,98%), quando colocado em ambas as concentrações, com uma maior inibição na concentração de 10 mM. Na presença de 10 mM, os íons  $Ca^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  aumenta a atividade da enzima de 12,88 e 11,36%, respectivamente. Este resultado difere do efeito de cátions bivalentes ( $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) sobre a atividade de uma serina protease alcalina (70kDa) de *Bacillus licheniformis* NCIM-2042, nos quais o íon  $Ca^{2+}$  aumentou atividade em 8,4% e o íon  $Zn^{2+}$  reduziu atividade em 8,6% [24]. Os efeitos estimuladores de  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  em proteases alcalina de *Bacillus firmus* CAS7 foi relatado na literatura [4]. Os íons  $Hg^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , em ambas as concentrações, tem sido relatada na literatura como inibidores de protease alcalina produzida por *Aspergillus flavus* [22]. Semelhantemente aos resultados obtidos no presente trabalho, o qual os íons de metais  $Hg^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  tiveram efeito inibidor na atividade proteásica em ambas as concentrações.

**Tabela 4.** Efeito de íons de metais na atividade proteolítica.

Íons de Metais	5mM	10mM
	Atividade Residual (%)	Atividade Residual (%)
Control	100,0	100,0
K <sup>2+</sup>	100,0	100,0
Ca <sup>2+</sup>	100,0	112,88
Zn <sup>2+</sup>	100,0	111,36
Mg <sup>2+</sup>	106,89	116,39
Na <sup>2+</sup>	115,86	114,98
Fe <sup>2+</sup>	115,82	93,95
Hg <sup>2+</sup>	91,21	77,31
Cu <sup>2+</sup>	78,34	66,02

### 3.6. Efeito de inibidores na atividade proteolítica

O efeito de diferentes inibidores pode ser visto na Tabela 5. A atividade enzimática foi inibida por PMSF, inibidor de serino protease, mostrando uma atividade residual de 34,89%. Foi também inibida por EDTA (71,15%), inibidor de metaloprotease, β-mercaptoetanol (81,62%), inibidor de cisteíno protease e levemente inibida por ácido Idoacético (94,33%), inibidor de cisteíno protease, mas não foi inibida quando submetido a pepstatina A, inibidor de protease aspártica. Estes resultados permitiram a identificação da protease do extrato bruto produzido pela linhagem de *Aspergillus tamaritii* URM4634 como uma serino protease.

Os resultados deste estudo corroboram com o efeito do inibidor, PMSF, encontrado por Bhunia et al. [24] indicando que a enzima pertencia a classe das serino proteases, todavia o efeito do EDTA não foi observado pelos os autores [24]. Resultados semelhantes foram obtidos para protease alcalina produzida por *Aspergillus flavus* que demonstrou ser moderadamente afetada pelo EDTA apresentando 78% de atividade residual e a enzima foi abruptamente inibida em PMSF, indicando que a protease pertence à classe das serino proteases [22].

**Tabela 5.** Efeito de inibidores na atividade proteolítica.

<b>Inibidores</b>	<b>Atividade Residual (%)</b>
Controle	100.0
EDTA	71.15
PMSF	34.89
2- Mercaptaetanol	81.62
Ácido Idoacético	94.33
Pepstatina A	100.0

#### **4. CONCLUSÕES**

O substrato farelo de trigo foi uma fonte adequada para a produção de proteases por FES. A protease produzida por *A. tamarii* URM4634 demonstrou características enzimáticas que não demande pH e temperaturas elevadas nos processos biotecnológicos, apresentando estabilidade em pH alcalino e temperaturas mesófilas. A enzima é uma Serino Protease e inibida na presença dos íons  $Hg^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . Estas propriedades bioquímicas fazem da protease de *A. tamarii* URM4634 uma enzima adequada para aplicação na indústria de detergente, processamento de couro e farmacêutica.

#### **5. AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à FACEPE (Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) pela bolsa de estudos, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Conselho Nacional para a Melhoria do Ensino Superior), pelo suporte financeiro.

**REFERÊNCIAS**

- [1] Zanphorlin LM, Facchini FDA, Vasconcelos F, Bonugli-Santos RC, Rodrigues A, Sette LD, et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *J Microbiol* 2010;48:331–6.
- [2] Padmapriya B, Rajeswari T, Nandita R, Raj F. Production and Purification of Alkaline Serine Protease from Marine *Bacillus* Species and Its Application in Detergent Industry 2012;4:21–6.
- [3] Vishwanatha KS, Rao a GA, Singh SA. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010;37:129–38.
- [4] Annamalai N, Rajeswari MV, Sahu SK, Balasubramanian T. Purification and characterization of solvent stable, alkaline protease from *Bacillus firmus* CAS 7 by microbial conversion of marine wastes and molecular mechanism underlying solvent stability. *Process Biochem* 2014.
- [5] Yin L-J, Hsu T-H, Jiang S-T. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. *J Agric Food Chem* 2013;61:662–6.
- [6] Dhandapani B, Mahadevan S, Dhilipkumar SS, Rajkumar S, Mandal AB. Impact of aeration and agitation on metabolic heat and protease secretion of *Aspergillus tamaris* in a real-time biological reaction calorimeter. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94:1533–42.
- [7] Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar DG, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C. Production, Purification and Characterization of Protease by *Aspergillus flavus* under Solid State Fermentation. *Jordan Journal of Biological Science* 2011;4:137 – 148.
- [8] Paranthaman R, Alagusundaram K, Indhumathi J. Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *World J Agric Sci* 5 2009;5:308–12.
- [9] Dutta J, Dutta P, Banerjee R. Kinetic study of a low molecular weight protease from newly isolated *Pseudomonas* sp. using artificial neural network. *Indian J Biotechnol* 2005;4:127–33.
- [10] Ginther CL. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrob Agents Chemother* 1979;15:522–6.
- [11] Ahmed I, Zia MA, Iqbal HMN. Purification and Kinetic Parameters Characterization of an Alkaline Protease Produced from *Bacillus subtilis* through Submerged Fermentation Technique. *World Appl Sci J* 2011;12:751–7.
- [12] Anandan D, Marmer WN, Dudley RL. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamaris*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:339–47.

- [13] Shabbiri K, Adnan A, Jamil S. Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, using statistical approach. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012;1051–61.
- [14] Yadav J, Chowdhury S, Chaudhuri S. Purification and characterization of an extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* isolated from East Calcutta wetland. *J Biol Sci* 2010;10:424–31.
- [15] Pushpam PL, Rajesh T, Gunasekaran P. Identification and characterization of alkaline serine protease from goat skin surface metagenome. *AMB Express* 2011;1:3.
- [16] Papagianni M, Sergelidis D. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;172:3926–38.
- [17] Charles P, Devanathan V, Anbu P, Ponnuswamy MN, Kalaichelvan PT, Hur B-K. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J Basic Microbiol* 2008;48:347–52.
- [18] Dubey R, Adhikary S, Kumar J, Sinha N. Isolation , Production , Purification , Assay and Characterization of Alkaline Protease Enzyme from *Aspergillus niger* and its Compatibility with Commercial Detergents. *Dev Microbiol Mol Biol* 2010;1:75–94.
- [19] Devi M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. *Indian J ...* 2008;1:1–6.
- [20] Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem* 2003;38:1553–8.
- [21] Yadav SK, Bisht D, Darmwal NS. Oxidant and solvent stable alkaline protease from *Aspergillus flavus* and its characterization. *African J Biotechnol* 2011;10:8630–40.
- [22] Kranthi VS, Rao DM, Jaganmohan P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int J Microbiol* 2012;1:12–5.
- [23] Hernández-Martínez R, Gutiérrez-Sánchez G, Bergmann CW, Loera-Corral O, Rojo-Domínguez a., Huerta-Ochoa S, et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem* 2011;46:2001–6.
- [24] Bhunia B, Basak B, Mandal T, Bhattacharya P, Dey A. Effect of pH and temperature on stability and kinetics of novel extracellular serine alkaline protease (70 kDa). *Int J Biol Macromol* 2013;54:1–8.
- [25] STATISTICA (data analysis software systems); Statsoft Inc. version 8.0, 2008

