UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e
estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus***

Ana Claudia Rodrigues de Siqueira

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e
estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus***

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

**Orientada: Ana Claudia Rodrigues de
Siqueira**

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

**Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 15/03/2013. A versão original
encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto/USP.**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Siqueira, Ana Claudia Rodrigues

Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus*. Ribeirão Preto, 2013.

67 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton.

1. Enzimologia 2. Biotecnologia 3. Bioprocessos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Claudia Rodrigues de Siqueira

Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória:

Deus pela vida e pelos caminhos
aos quais me trouxeram onde estou.

A Nossa Senhora pela
intercessão, proteção e bênçãos
concedidas.

À minha família pelo amor
incondicional, apoio, incentivo, ajuda e
compreensão. Palavras não bastam
pra demonstrar minha gratidão.

Agradecimento

Aos meus pais, Maria Madalena e Vilmar pelo amor e apoio e a minha irmã Isabel pelo companheirismo.

À minha família e amigos em Goiânia pelo incentivo que mesmo longe estiveram comigo de alguma forma.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela oportunidade, orientação e amizade.

À Nathalia G. Rosa pela ajuda e amizade.

À Andrezza, Ronivaldo, Gabriel, Youssef e Tamara pela amizade e dias de risadas e muito trabalho no laboratório de Tecnologia Enzimática.

Aos amigos de Ribeirão Preto pelo companheirismo e amizade.

Ao Dr. Benevides Pessela pelo apoio, amizade e colaboração neste trabalho.

Aos amigos de Madrid pela compreensão e apoio.

Aos Profs Drs. Telma Alves Garcia, Mariângela Santiago e Edemilson Cardoso por me apresentarem à pesquisa e à área da enzimologia.

Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela possibilidade de execução deste trabalho.

Às agências de fomento, CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

*"A mente que se abre a uma nova ideia jamais
voltará ao seu tamanho original. "*

Albert Einstein

RESUMO

SIQUEIRA, A. C. R. Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e estabilização de peptidase secretada pelo fungo *Aspergillus terreus*. 2013. 67 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Os fungos filamentosos são utilizados em larga escala na produção de produtos biotecnológicos na indústria devido a sua versatilidade e um dos exemplos são as peptidases que representam uma das principais classes de enzimas hidrolíticas. As peptidases são hidrolases que catalisam a quebra das ligações peptídicas das proteínas e que nos microrganismos são responsáveis por funções fisiológicas e patológicas, além de ter muitas aplicações em diversos campos industriais. Neste estudo foram analisados diferentes bioprocessos fermentativos para produção de peptidases pelo fungo *Aspergillus terreus*. Este microrganismo foi capaz de produzir peptidases em ambos os bioprocessos, sólido ou submerso, obtendo melhor performance e o pico de produção no bioprocessos fermentativo sólido de valor 677U/mL, nas condições 5g de farelo de trigo, 72 horas, 30°C e 75% de umidade. Utilizando o bioprocessos fermentativo submerso também obtivemos resultados satisfatórios com pico de atividade de 360U/mL, nas condições de meio padrão suplementado com Caseína 0,5%, 72 horas e 35°C. A caracterização bioquímica parcial dos extratos dos dois bioprocessos mostrou semelhanças entre algumas características das enzimas produzidas como a faixa extensa de pH ótimo abrangendo regiões ácidas, neutra e alcalinas, temperatura ótima pontual de 55°C e perfil de inibição pelo PMSF e EDTA. Contudo, os perfis de estabilidade (pH e temperatura) e comportamento frente a adição de íons apresentaram respostas diferentes entre si, o que sugere a produção de enzimas diferentes produzidas pelo mesmo fungo em meios distintos. A microencapsulação por *Spray Drying* como processo de estabilização foi satisfatória obtendo rendimentos de 37,5-58,2% e com níveis acima de 50% de atividade enzimática. Em contrapartida, a imobilização enzimática demonstrou ser eficaz na etapa de ligação ao suporte, mas não foi capaz de estabilizar a enzima presente no extrato, o que ficou caracterizado pela perda de atividade proteolítica.

Palavras-chave: peptidase, bioprocessos fermentativos, fungos filamentosos, microencapsulação, imobilização.

ABSTRACT

SIQUEIRA, A. C. R. **Fermentation bioprocesses, purification, characterization and stabilization of peptidase secreted by the fungus *Aspergillus terreus***. 2013. 67 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Filamentous fungi are extensively used in the production of biotechnological products in industry because of their versatility and one of the examples are peptidases which constitute a major class of hydrolytic enzymes. The peptidases are hydrolases which catalyze the cleavage of peptide bonds of proteins and microorganisms that are responsible for the physiological and pathological roles, in addition to having many applications in various industrial fields. This study evaluated various bioprocesses for fermentative production of peptidases by the fungus *Aspergillus terreus*. This microorganism was able to produce peptidase in both bioprocess, solid or submerged, achieving better performance in the solid bioprocess with peak of production of 677U/mL under the conditions 5g wheat bran, 72 hours, 30°C and 75% humidity. Using submerged fermentation bioprocess we also obtained satisfactory results with peak of activity of 360U/mL with conditions of standard medium supplemented with 0.5% casein, 72 hours and 35°C. Biochemical characterization of the two partial purified extracts showed similarities between some characteristics of the enzymes produced, as large optimum pH range spanning regions acidic, neutral and alkaline point temperature optimum of 55 ° C and the inhibition profile of PMSF and EDTA. However, the stability profiles (pH and temperature) and behavior in addition ions showed different responses to each extract, which suggests the production of different enzymes in different ways. Microencapsulation by Spray Drying and stabilization process was obtaining satisfactory yields of 37.5 to 58.2%, with levels above 50% of enzyme activity. In contrast, the enzyme immobilization step was effective in bonding the support, but was not able to stabilize the enzyme present in the extract, which was characterized by the loss of proteolytic activity.

Keywords: peptidase, fermentation bioprocesses, filamentous fungi, microencapsulation, immobilization.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** *Aspergillus terreus* (<http://fungi.myspecies.info>) 6
- Figura 2.** Esquema do processo de secagem. 1) Sistema de bombeamento e controle de vazão da alimentação do material a ser seco; 2) Sistema de atomização; 3) Sistema de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem; 4) Sistema da alimentação de ar para secagem; 5) Câmara de secagem; 6) Sistema de separação ar-pó seco e coleta (ROSA et al., 2006). 9
- Figura 3.** Esquema ilustrativo de suportes (A) aniônico e (B) catiônico. 11
- Figura 4.** Fluxograma geral das etapas de metodologia realizadas neste estudo. 14
- Figura 5.** Esquema de recipiente utilizado em BFSd. **(1)** saco de polipropileno de dimensões 12x20cm; **(2)** mola de fio de cobre encapado; **(3)** tubo rígido de polietileno de alta densidade de dimensões 5cm de altura x 2,2cm de diâmetro; **(4)** meio fermentativo. 15
- Figura 6.** Erlenmeyer haletado **(A)** e padrão **(B)** utilizados no bioprocesso fermentativo submerso para promoção da aeração do meio pela agitação em shaker a 120 rpm. 17
- Figura 7.** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte iônico DEAE-agarose, onde o suporte é carregado positivamente e liga-se a porção da enzima carregada negativamente. 25
- Figura 8.** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte iônico MANAE-agarose, onde o suporte é carregado positivamente e liga-se a porção da enzima carregada negativamente. *Fonte: Fernandez-Lafuente et al, 1993. 28
- Figura 9.** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Bromocianógeno; grupo reativo do suporte: imido carbonato/ grupo reativo da enzima: região amino terminal e/ou aminas de baixo pKa. *Fonte: Palomo, 2003. 27
- Figura 10.** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Glioxil-agarose; grupo reativo do suporte: aldeído alifático/grupo reativo da enzima: amina das lisinas. *Fonte: Palomo, 2003. 28
- Figura 11.** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Epoxi-agarose; grupo reativo do suporte: grupos epóxido/ grupo reativo da enzima: 1) Etapa de adsorção: zona mais hidrofóbica; 2) Etapa covalente: amina das lisinas, hidroxilas da tirosina, serina e SH das cisteínas. *Fonte: Palomo, 2003. 29
- Figura 12:** Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente amino glutaraldeído; grupo reativo do suporte: aldeídos cíclicos/ grupo reativo da enzima: região amino terminal e/ou aminas de baixo pKa. *Fonte: Galego-López, 2006. 30
- Figura 13:** Esquema geral do Bioprocesso fermentativo sólido quanto ao desenvolvimento das melhores condições de cultivo. 31
- Figura 14:** BFSd – Influência de diferentes fontes proteicas na produção de 32

peptidases por *A. terreus*. (A) e (B) Somente Farelo de trigo (FT) ou com suplementações de caseína ou albumina; (C), (D) e (E) Somente FT ou Farelo de Algodão (FA) ou com suplementação de farelo de trigo (no caso do FA), glúten ou proteína de soja; (F) Somente FT, FA ou Feno de Alfafa.

Figura 15: BFSd – Influência da concentração de esporos no cultivo e produção 34 de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT incubado a 30°C.

Figura 16: Influência da temperatura de cultivo na produção de peptidases pelo 35 fungo *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT e 1×10^6 esporos/g.

Figura 17: Influência da umidade inicial na produção de peptidases pelo fungo 36 *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT e 1×10^6 esporos/g, incubado a 30°C.

Figura 18: Esquema geral do Bioprocesso fermentativo submerso quanto ao 37 desenvolvimento das melhores condições de cultivo.

Figura 19: Influência na produção de peptidases por *A. terreus* de diferentes 38 fontes de nitrogênio em três diferentes concentrações e controle. (A) Caseína; (B) Peptona; (C)*EL – Extrato de levedura; (D)**SA – Sulfato de amônio.

Figura 20: Influência na produção de peptidases por *A. terreus* de diferentes 39 fontes de carbono em quatro diferentes concentrações e controle. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose.

Figura 21: BFSm – Influência da concentração de esporos no cultivo e produção 40 de peptidases pelo fungo *A. terreus*.

Figura 22: BFSm - Influência do pH e temperatura de cultivo na produção de 41 peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultivo composto por sais inorgânicos e 0,5% de caseína.

Figura 23: BFSm - Influência da aeração de cultivo na produção de peptidases 42 pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultivo composto por sais inorgânicos e 0,5% de caseína.

Figura 24: Influência do pH (faixa 4,5-10,5, com incrementos de 0,5) na 43 atividade enzimática. **(A)** BFSd – pH ótimo **(B)** BFSm – pH ótimo. Ensaios realizados com substrato azo-caseína a 45°C.

Figura 25: Influência da temperatura (faixa 30-75°C, com incrementos de 5,0) na 44 atividade enzimática. **(A)** BFSd – Temperatura ótima **(B)** BFSm – Temperatura ótima. Ensaios realizados com substrato azo-caseína em pH 6,5 (BFSd) e 7,0 (BFSm).

Figura 26: **(A)** Estabilidade em pH (faixa 4,5-10,5, com incrementos de 0,5) na 45 atividade enzimática, nos períodos de 1 e 24 horas; **(B)** Estabilidade em temperatura em tempos de exposição de 5, 15 e 60 minutos.

Figura 27: Influência da adição de inibidores, na atividade proteolítica de 46 peptidases obtidas pelo fungo *A. terreus* **(A)** BFSd e **(B)** BFSm. A atividade proteolítica foi determinada com substrato azo-caseína a 55°C, em tampão MES pH 6,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.

Figura 28: Influência da adição de íons, na atividade proteolítica de peptidases 47 obtidas do **(A)** BFSd e **(B)** BFSm, pelo fungo *A. terreus*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato azo-caseína a 55°C, em tampão MES pH 6,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.

Figura 29: Cromatograma da primeira etapa de purificação do extrato 48 precipitado do fungo *A. terreus*. Fonte: Purificação por Gel filtração utilizando coluna cromatográfica com resina Sephadex G-50, método por exclusão de massas.

Figura 30: Eletroforese SDS-PAGE das frações cromatográficas por gelfiltração 49 Sephadex G-50. **(A)** Frações iniciais (57-62); **(B)** Frações finais (74-79).

Figura 31: Cromatograma da etapa de troca iônica absorbância x gradiente de 49 sal – 0 – 200mM de NaCl x Atividade enzimática.

Figura 32: Eletroforese SDS-PAGE das frações cromatográficas por troca iônica 50 Source 15Q.

Figura 33: Estudo prévio para determinação de adjuvantes para posterior 51 experimento por planejamento experimental. **(A)** Rendimento; **(B)** atividade enzimática. *EB – Extrato bruto seco sem adição de adjuvantes.

Figura 34: Gráficos da interação dos parâmetros envolvidos no processo de 53 microencapsulação para análises de rendimento (A e B) e atividade enzimática relativa (C e D).

Figura 35: Perfil de estabilidade de atividade enzimática após 30, 60 e 90 dias 54 de armazenamento a temperatura ambiente (25°C). A atividade enzimática apresentada por cada um dos experimentos no dia 0 (imediatamente após a secagem) foi considerada como 100% de atividade relativa. EB: Extrato bruto não submetido à microencapsulação

Figura 36: Perfil de estabilidade de atividade enzimática após 30, 60 e 90 dias 55 de armazenamento sob refrigeração (4-8°C). A atividade enzimática apresentada por cada um dos experimentos no dia 0 (imediatamente após a secagem) foi considerada como 100% de atividade relativa. EB: Extrato bruto não submetido à microencapsulação

Figura 37: Estudo de estabilizantes para o extrato dialisado proveniente do 57 BFSm. *Padrão corresponde ao extrato bruto dialisado inicial (sem adição de estabilizante); **Tempo zero corresponde ao extrato bruto dialisado assim que é adicionado o estabilizante.

Figura 38: **(A)** Porcentagem imobilizada da enzima em cada suporte obtida 57 através da proporção de atividade da suspensão pelo sobrenadante, durante tempo determinado; **(B)** porcentagem absoluta imobilizada de enzima obtida a partir da comparação da atividade do extrato bruto.

Figura 39: Estudo de estabilidade da peptidase produzida por *A. terreus* 58 imobilizada em Bromocianogeno, DEAE, Manae, Glutarealdeído e também do extrato bruto dialisado submetido a imobilização.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho experimental para microencapsulação do extrato fermentado produzido pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i> em bioprocesso fermentativo em estado sólido.	23
Tabela 2. Condições iniciais de secagem do extrato fermentado ajustadas no equipamento de spray dryer modelo MSD 0.5 Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil.	23
Tabela 3. Informações gerais da caracterização dos extratos de BFSd e BFSm.	47
Tabela 4. Percentual de rendimento do processo de microencapsulação da peptidase produzida pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i> , em BFSd.	52
Tabela 5. <i>p</i> valor referentes a cada resposta desejada.	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Pro	Prolina
Glt	Glutamina
BFSm	Bioprocesso fermentativo submerso
BFSd	Bioprocesso fermentativo sólido
PDA	<i>Potato dextrose agar</i>
FT	Farelo de trigo
FA	Farelo de algodão
TCA	Ácido tricloroacético
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoridro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
CMC	Carboximetilcelulose
EE/Ad	Proporção extrato enzimático/adjuvante
Ts	Temperatura de secagem
VA	Vazão de alimentação
EFDi	Extrato fermentado dialisado
SA	Sulfato de amônio

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Peptidases	2
1.1.1. Aplicações industriais das peptidases	3
1.1.1.1. Indústria farmacêutica, médica e cosmética	3
1.1.1.2. Indústria de alimentos	4
1.1.1.3. Indústria de detergentes	5
1.1.1.4. Indústria de couro	5
1.1.1.5. Biorremediação e tratamento de resíduos	5
1.2. Microrganismos e Biotecnologia	6
1.2.1. <i>Aspergillus terreus</i>	6
1.3. Bioprocessos Fermentativos	7
1.3.1. Bioprocesso fermentativo submerso	7
1.3.2. Bioprocesso fermentativo sólido	7
1.4. Estabilização de enzimas	8
1.4.1. Microencapsulação	8
1.4.2. Imobilização em suportes inertes	9
1.4.2.1. Suportes de ligação iônica	11
1.4.2.2. Suportes de ligação covalente	12
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Microrganismo e manutenção	14
3.2. Bioprocessos Fermentativos	15
3.2.1. Bioprocesso Fermentativo em estado Sólido (BFSd)	15
3.2.2. Bioprocesso Fermentativo em estado Submerso (BFSm)	16
3.3. Ensaio de atividade proteolítica – Substrato caseína	17
3.4. Ensaio de atividade proteolítica para caracterização parcial – substrato Azo-caseína	18
3.5. Purificação	20
3.5.1. Precipitação de proteínas	20
3.5.2. Filtração tangencial	20
3.5.3. Cromatografia por exclusão de massa e troca iônica	20
3.5.4. Determinação de proteínas totais	21

3.5.5.	Avaliação do grau de pureza	21
3.6.	Microencapsulação	22
3.6.1.	Estabilidade das micropartículas	24
3.7.	Imobilização em suportes inertes.....	24
3.7.1.	Suportes de adsorção iônica – Ativação e processo de imobilização de enzimas 25	
3.7.1.1.	DEAE – agarose.....	25
3.7.1.2.	MANAE – agarose.....	26
3.7.2.	Suportes covalentes - Ativação e processo de imobilização de enzimas 27	
3.7.2.1.	Bromocianógeno	27
3.7.2.2.	Glioxil – agarose.....	27
3.7.2.3.	Epóxido – agarose	29
3.7.2.4.	Glutaraldeído.....	30
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1.	Bioprocesso Fermentativo Sólido (BFSd)	31
4.1.1.	Efeito de fontes de nitrogênio na produção de peptidases em BFSd ..	31
4.1.2.	Efeito da concentração de esporos na produção de peptidases em BFSd 33	
4.1.3.	Efeito da temperatura na produção de peptidases em BFSd.....	34
4.1.4.	Efeito da umidade inicial na produção de peptidases em BFSd	35
4.2.	Bioprocesso Fermentativo Submerso (BFSm)	36
4.2.1.	Efeito de fontes de nitrogênio na produção de peptidases em BFSm 37	
4.2.2.	Efeito de fontes de carbono na produção de peptidases em BFSm	38
4.2.3.	Efeito da concentração de esporos na produção de peptidases em BFSm 39	
4.2.4.	Efeito do pH e temperatura na produção de peptidases em BFSm.....	40
4.3.	Caracterização bioquímica do Extrato precipitado - BFSd X BFSm.....	41
4.3.1.	Determinação do pH ótimo	42
4.3.2.	Determinação da temperatura ótima.....	43
4.3.3.	Estabilidade enzimática a pH e temperatura.....	44
4.3.4.	Classificação das peptidases.....	45
4.3.5.	Efeito de íons sobre a atividade enzimática.....	46
4.4.	Purificação – BFSd	47
4.4.1.	Filtração tangencial.....	48
4.4.2.	Precipitação por etanol	48
4.4.3.	Cromatografia por exclusão de massa e troca iônica	48
4.5.	Microencapsulação	50
4.5.1.	Estabilidade das micropartículas após armazenamento a temperatura ambiente ou sob refrigeração.....	54
4.6.	Imobilização	56
5.	CONCLUSÕES.....	60
6.	REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

As enzimas são produtos biotecnológicos utilizados desde 1897 quando Büchner descobriu que enzimas extraídas de leveduras poderiam transformar açúcar em álcool. Desde então ocorreu um crescimento e desenvolvimento de processos envolvendo tais macromoléculas (BUCHHOLZ et al, 2012).

Estas proteínas são consideradas catalisadores de reações que sem a presença delas ocorreriam lentamente ou não aconteceriam, sem ao final serem alteradas ou degradadas. Elas são consideradas mais eficientes devido a sua especificidade e seletividade aos substratos utilizados, são biodegradáveis (importante para as indústrias que têm procurado processos mais “limpos”) e atuam em condições também específicas, podendo ser brandas ou extremas. (MALAJOVICH, 2011).

As principais enzimas empregadas na indústria de forma geral pertencem à classe das hidrolases, destas podemos destacar as peptidases (59%), carboidrases (28%), lipases (3%) e enzimas analíticas e farmacêuticas (10%). E suas aplicações estendem-se às indústrias de alimentos e bebidas, de produtos de limpeza, têxtil, couro, cosmética, farmacêutica e também nos tratamentos médicos (MALAJOVICH, 2011).

A importância destas macromoléculas é comprovada não somente pelo crescimento da utilização em processos industriais mas também pelo faturamento que este mercado tem mostrado, em 1998 foram arrecadados cerca de 1,6 bilhões de dólares, chegando a 5,1 bilhões de dólares em 2009 e em 2015 este valor pode chegar a 8 bilhões de dólares (SANCHEZ & DEMAINE, 2011; FREEDONIA GROUP, 2011).

O mercado de enzimas no Brasil em 2009 foi avaliado em 200 milhões de dólares, sendo que em 2011 o valor importado foi de 119 milhões e de exportação 52 milhões de dólares, de 2007 a 2011 foram comprovados que o valor de importação de enzimas triplicou enquanto o de exportação teve um pequeno crescimento (MDIC - Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior, 2010 e 2012). Grande parte da fatia deste mercado é relativa a produção de peptidases direcionadas a diferentes áreas da indústria.

1.1. Peptidases

As peptidases são hidrolases que catalisam a quebra da ligação peptídica de proteínas e peptídeos (KUMAR & TAGAKI, 1999). Elas também são conhecidas como enzimas proteolíticas, proteinases ou proteases, estas diferentes denominações deram-se em períodos diversos para determinação de endo ou exopeptidases (BARRET & MCDONALD, 1986), porém o nome peptidase é utilizado atualmente para determinação dessa classe de forma geral por sugestão da União internacional de bioquímica e biologia molecular, Comitê de classificação de enzimas (RAWLINGS et al., 2011).

Cerca de 2% do genoma dos seres vivos codificam peptidases, as quais são atribuídas distintas funções, desde a regulação de processos fisiológicos e patológicos, à degradação de proteínas, proteção contra invasores, entre outras. A forma de controle existente para estas macromoléculas é realizada pelo controle gênico, produção de zimogênios ou ativação e inibição enzimática (GARCIA-CARREÑO & DEL TORO, 1997).

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com o pH ótimo de atividade em ácidas, neutras ou alcalinas, pela ação catalítica em endopeptidases (atuam em regiões afastadas das porções amino e carboxi terminal de proteínas e peptídeos) ou exopeptidases (atuam nas regiões amino terminal – aminopeptidase – ou carboxi terminal – carboxipeptidase).

Em relação à natureza de seu sítio catalítico, essa classe de enzima também é classificada como serino, cisteíno, aspartil, metalo, treonino ou glutâmico peptidases quando há em seu sítio ativo um resíduo destes aminoácidos ou sítio de ligação para metal. E de acordo com a fonte, podem ser classificadas em animal (tem como principal desvantagem, o inconveniente da difícil obtenção devido à bioética aplicada ao abate de animais), vegetal (tem como restrições a sazonalidade e a obtenção destas enzimas) ou a partir de microrganismos (fonte que tem sido aplicada e estudada intensamente desde produção bruta das proteínas através de bioprocessos fermentativos ou a partir do uso de ferramentas de biologia molecular) (RAO et al, 1998; PALMA et al, 2002; LÓPEZ, 2010).

Os microrganismos são fontes interessantes para a produção de peptidases uma vez que apresentam ampla diversidade bioquímica, fácil cultivo e manutenção, custo diminuído e possibilidade de manipulação genética para melhora ou modificação do produto desejado.

Logo, as peptidases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas utilizadas atualmente, e tem como principal fonte as linhagens de *Bacillus* sp, entretanto existe uma busca incessante de novos microrganismos produtores de peptidases, incluindo os fungos filamentosos, e também de novas condições e meios de cultura que podem aumentar o rendimento e diminuir custos das produções já existentes (LADEIRA et al, 2010). Uma vez que, é estimado que cerca de 30 -40% do custo da produção de peptidases é proveniente da obtenção do meio de cultivo, comprovando assim a necessidade do desenvolvimento de meios mais baratos para a produção de enzimas. (NASCIMENTO & MARTINS, 2006).

1.1.1. Aplicações industriais das peptidases

1.1.1.1. Indústria farmacêutica, médica e cosmética

As peptidases são enzimas versáteis e de diferentes aplicações, como por exemplo, a utilização de collagenases na remoção de manchas e quelóides, tratamento de queimaduras, e úlceras (SUKHOSYROVA et al, 2003).

Podemos destacar a aplicação de collagenases sobre as fibras de colágeno, neste caso para gerar peptídeos que apresentam diversas atividades biológicas de interesse industrial, conduzindo para estabelecimento de uma ampla variedade de aplicações, em geral para agentes imunoterapêuticos (TSURUOKA et al, 2003).

As queratinases são peptidases com atividade sobre a queratina (um grupo de proteínas fibrosas e insolúveis). São aplicadas na indústria farmacêutica para a remoção de calosidade de seres humanos. Outra possível aplicação das queratinases é na remoção da queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses (BOM & VERMELHO, 2004).

A diarreia celíaca, também conhecida como doença celíaca ou enteropatia sensível ao glúten é uma doença autoimune do intestino delgado, causado pela ingestão das proteínas do glúten de ampla prevalência em fontes de alimentos tais como trigo, centeio e cevada. Ela comumente aparece de forma precoce na infância apresentando diferentes sintomas, incluindo diarreia crônica e distensão abdominal. O principal componente tóxico do glúten do trigo é a proteína gliadina com regiões ricas em Pro e Gln (SHAN et al, 2002).

As prolil endopeptidases ou prolil oligopeptidases da subclasse das serino peptidases, são peptidases específicas em hidrolisar resíduos de prolina e são chaves terapêuticas para tal doença do sistema digestivo. Elas são amplamente

distribuídas em bactérias, fungos, animais e plantas. E são importantes não somente em processos fisiológicos, mas também tem considerável interesse em aplicações bioquímicas e clínicas (SHAN et al, 2004).

Outras funções promissoras para peptidase na indústria farmacêutica são atuação em tratamentos antitumorais (WILSON & SINGH, 2008), antiplaquetários (nos receptores ativadores de peptidase) (HAMILTON, 2009), e ainda antirretrovirais, principalmente para HIV-1, onde a partir da peptidase do vírus pode ser obtido um inibidor, porém se houver mutações o inibidor deixa de ser eficaz (BROGLIA et al, 2008).

Na cosmetologia as principais peptidases utilizadas são as collagenases e queratinases que hidrolisam as ligações peptídicas do colágeno e queratina do *estratum* córneo da pele, promovendo a renovação celular pela remoção das células mortas presentes na epiderme, levando a restauração da mesma (YONG-CHUL et al, 2000; LODS et al, 2000). Também são utilizadas enzimas como a papaína, bromelina e outras peptidases para realização de alisamento e *peeling*.

1.1.1.2. Indústria de alimentos

Na indústria de alimentos a utilização de enzimas vem desde a antiguidade. Uma das principais aplicações das peptidases é na área de laticínios principalmente na produção de queijos a partir da coagulação do leite, produção de leite para crianças (RAO et al, 1998; NOVOZYMES, 2008) e peptídeos livres biologicamente ativos e que têm sido empregados como importante fonte de aminoácidos em casos de intolerância infantil a proteínas do leite (SINHA & SINHA, 2007).

Na panificação, peptidases (endopeptidases e exopeptidases) de *Aspergillus oryzae* têm sido utilizadas na hidrólise limitada das proteínas insolúveis (glúten) da farinha de trigo, garantindo melhor solubilidade e redução no tempo de preparo da massa de pão, (RAO et al, 1998).

Nos hidrolisados proteicos o emprego das peptidases tem sido feito para promover o melhoramento do sabor, que em geral apresentam sabor amargo decorrente da liberação de resíduos peptídicos contendo aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades e resíduo de prolina no centro da molécula (FITZGERALD & O'CUINN, 2006).

1.1.1.3. Indústria de detergentes

Uma das áreas de maior utilização das peptidases é na produção de detergentes, onde são empregados na remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais, além da limpeza de lentes de contato e dentaduras (RAO et al, 1998). As peptidases de maior uso são as alcalinas (HAJJJI et al, 2007), devido à sua atividade e estabilidade em temperatura e pH elevado (acima de 8), além de sua ação em uma ampla variedade de substratos proteicos e a possível combinação com amilases, celulasas e lipases, porém existe o desafio de evitar a própria hidrólise da enzima, utilizando inibidores reversíveis (LUZ, 2007).

1.1.1.4. Indústria de couro

A utilização das peptidases nas diversas etapas do tratamento do couro consistem na degradação da matriz celular para dar lugar à água na primeira etapa, em seguida juntamente com lipases e produtos químicos, as peptidases limpam e relaxam o couro deixando-o pronto para curtir, que adicionados a um complexo de mais duas peptidases deixam o couro suave para terminar a sua confecção utilizando outros produtos químicos e enzimáticos (NOVOZYMES, 2008).

O uso de peptidases assegura a redução da poluição ambiental e também melhoria na qualidade do couro, sendo sua utilização baseada na hidrólise seletiva de proteínas não colágenas e não fibrosas como albumina e globulina, (RAO et al, 1998). Pesquisas vem sendo realizadas com finalidade de aplicação de peptidases no processo da retirada dos pelos presentes no couro, uma vez que esta etapa produz grande quantidade de agentes tóxicos (JIAN et al, 2011).

1.1.1.5. Biorremediação e tratamento de resíduos

Peptidases alcalinas têm sido utilizadas no tratamento de resíduos da indústria de alimentos e esgoto doméstico com a finalidade da degradação de penas e pelos de forma mais limpa e eficaz (GUPTA et al, 2002).

Estas enzimas também são utilizadas para degradação de proteínas fibrosas de animais tais como penas, chifres, cabelos e unhas. A ação das peptidases sobre estes resíduos, disponibiliza material que pode ser empregado para o processamento de cola de uso em carpintaria e suplemento proteico de ração animal, utilizando por exemplo a peptidase alcalina de *Bacillus subtilis* (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997).

1.2. Microrganismos e Biotecnologia

Dada a grande versatilidade dos fungos filamentosos o uso destes vêm tornando-se comum para a produção de produtos biotecnológicos através de fermentações. Alguns fungos são conhecidos pela produção de ácidos orgânicos, enzimas, polissacarídeos, antibióticos e alcaloides (EL-ENSHASY,2007).

1.2.1. *Aspergillus terreus*

Figura 1: *Aspergillus terreus* (<http://fungi.myspecies.info>).

Aspergillus terreus (Figura 1) é um fungo filamentoso amplamente distribuído no meio ambiente (áreas tropicais e subtropicais), pode ser encontrado tanto no solo quanto em matéria vegetal (SYMOENS et al, 2000). Este fungo é discutido na literatura por diferentes focos, sendo tratado como grande produtor de ácido itacônico – utilizado na fabricação de polímeros sintéticos, herbicidas, xampus, entre outros – ou como produtor de lovastatina – fármaco blockbuster da Indústria Merck, utilizado para tratamento de hipercolesterolemia e doenças cardiovasculares (BENETT, 2010), ou ainda produtor de diferentes tipos de enzimas como as celulases (GAO et al, 2008), lipases (GULATI et al, 2000), peptidases (CHAKRABARTI et al, 2000), entre outras. Esta espécie também é clinicamente importante por ser causador desde micoses superficiais a infecções sistêmicas

principalmente em pacientes imunocomprometidos (SYMOENS et al, 2000; BALAJEE, 2009).

1.3. Bioprocessos Fermentativos

Bioprocessos caracterizam qualquer processo no qual há participação de um agente biológico e nele esteja definido um conjunto de operações onde inicialmente a matéria-prima/resíduo seja tratada como meio e esterilizado, e ocorra a transformação do substrato em produto por rota bioquímica, seguida por processos de “*downstream*”. No caso do bioprocesso fermentativo o foco é a utilização de microrganismos como maquinário para obtenção de produtos biotecnológicos (PEREIRA et al, 2008).

Estes bioprocessos fermentativos podem ser classificados em dois tipos: Bioprocesso fermentativo submerso (BFSm) e Bioprocesso fermentativo sólido (BFSd) (PANDEY, 2003; SINGHANIA et al, 2010).

1.3.1. Bioprocesso fermentativo submerso

No BFSm o microrganismo e os componentes do meio estão diluídos em água. Este método tem como vantagens o maior controle do processo (aeração, temperatura e pH), e a facilidade na recuperação das enzimas extracelulares, micélios e esporos e como desvantagens o produto estar diluído, promovendo instabilidade do extrato enzimático em comparação com a fermentação em estado sólido (SANDHYA et al, 2005; SINHA & SINHA, 2007). Por volta de 75% das enzimas produzidas na indústria é proveniente de BFSm devido a facilidade de obtenção destes produtos (SUBRAMANIAM; VIMALA, 2012).

1.3.2. Bioprocesso fermentativo sólido

Em contrapartida, no BFSd há carência de água no meio, somente o suficiente para manter o crescimento (PANDEY et al, 2000). O material utilizado, na maioria das vezes são resíduos agroindustriais, que servem tanto como suporte físico como fonte de nutrientes (PANDEY, 2003). As vantagens deste tipo de processo são a maior produção de biomassa num curto período de tempo, similaridade com habitat natural e os processos de “*downstream*” são facilitados devido à alta concentração do produto desejado. Porém também há desvantagens, como as impurezas presentes no produto, a falta de controle na temperatura interna

e umidade e a adequação dos fermentadores na escala industrial (GRAMINHA et al, 2008).

1.4. Estabilização de enzimas

1.4.1. Microencapsulação

Microencapsulação caracteriza-se pelo revestimento ou aprisionamento da molécula de trabalho com um polímero formando microesferas de 1-1000 µm. Esta técnica tem sido utilizada para encapsulação de diversos produtos como óleos, flavorizantes, extratos de plantas, enzimas, entre outros (RATHORE et al, 2012).

Os principais objetivos da microencapsulação são: proteção do produto em relação a temperatura, umidade, radiação UV ou interação com outros materiais; microencapsulação de produtos tóxicos ou prejudiciais; diminuição da taxa de evaporação ou transferência do produto encapsulado; transformação de produtos líquidos ou viscosos em pós, melhorando o fluxo; mascarar propriedades desagradáveis como o odor ou propriedades químicas como a atividade catalítica e controle da taxa de liberação do produto encapsulado (RÉ, 1998). São diferentes as técnicas de microencapsulação que incluem *freeze drying*, *air drying* e *spray drying*.

Spray drying é uma técnica que utiliza calor para remoção da água presente no meio e formação das micropartículas. Nesta tecnologia o fluido é atomizado através de um bico atomizador formando gotas que entram em contato imediato com fluxo quente de ar de secagem, a água presente é rapidamente evaporada, figura 2 (NATH; SATPATHY, 1998).

Figura 2: Esquema do processo de secagem. 1) Sistema de bombeamento e controle de vazão da alimentação do material a ser seco; 2) Sistema de atomização; 3) Sistema de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem; 4) Sistema da alimentação de ar para secagem; 5) Câmara de secagem; 6) Sistema de separação ar-pó seco e coleta (ROSA et al., 2006).

Spray drying também tem sido utilizada para microencapsulação de produtos sensíveis a temperatura como as enzimas, uma vez que há uma pequena exposição a alta temperatura, logo evita-se perda da atividade catalítica. O processo da remoção da água mesmo que de forma rápida pode provocar alguma alteração na estrutura química do composto, entretanto a substituição da umidade por um polímero pode evitar ou compensar essa modificação (NAMALDI et al, 2006).

1.4.2. Imobilização em suportes inertes

A imobilização de enzimas é definida como a adesão ou confinamento da proteína em região definida do espaço com a manutenção de sua atividade catalítica, podendo ser reutilizada repetidamente (ARROYO, 1998; BRENA & BATISTA-VIEIRA, 2006). A utilização de suportes inertes com esta finalidade data desde o ano 1967, com a imobilização de uma aminoacilase de *Arpergillus oryzae* para produção de uma mistura racêmica de aminoácidos (TOSA, et al¹, 1966 *apud* PARRA & CHUKHRAI, 2010), e esta metodologia segue sendo utilizada e aprimorada com a criação de novos suportes e condições de imobilização.

¹ TOSA T., MORI T., FUSE N., CHIBATA I. Studies on continuous enzyme reactions. I. Screening of carriers for preparation of water insoluble aminoacylase. *Enzymology*, v.31, p 214-224, 1966.

As principais vantagens apresentadas desta técnica são a estabilização e reutilização das enzimas imobilizadas e a possibilidade da criação de reatores específicos para a aplicação da enzima (tanques agitados com e sem alimentação contínua, leite fluidizado ou empacotado, entre outros). As desvantagens do processo de imobilização estão na alteração conformacional da estrutura da enzima (consequentemente pode modificar a obtenção do produto final ou a perda da atividade catalítica), existe também uma perda de atividade durante o processo de imobilização além do custo do complexo enzima-suporte ser maior que somente a enzima nativa (KLIBANOV, 1979; ABDELMAJEED et al, 2012).

Porém a estabilização/imobilização de enzimas nem sempre acontecem com o emprego de qualquer suporte, deve haver uma pesquisa extensa com suportes de diferentes características a fim de proporcionar a melhor escolha para cada proteína estudada.

A imobilização pode ser denominada como reversível e irreversível. Os tipos de interações enzima-suporte consideradas reversíveis são a adsorção física (interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio, força de van der Waals), ligações iônicas, interações por afinidade, ligações com metais e pontes de dissulfeto. Estas interações são consideradas relativamente fracas e podem levar ao fácil desligamento da enzima do suporte caso haja uma mudança das condições do meio ou mesmo um rompimento natural desta ligação.

Este tipo de suporte tem suas aplicações em processos de produção pois o custo de obtenção é reduzido e pode ocorrer a renovação do reator que é utilizado uma vez que há a quebra na ligação/interação enzima-suporte e então pode ser adicionado novo complexo enzima-suporte. Em contrapartida, os tipos de interações característica da imobilização irreversível são a formação de ligações covalentes entre suporte e enzima, aprisionamento, microencapsulação e *cross-linking*. Estas técnicas formam uma ligação forte entre suporte e enzima, a fim de estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo uma manutenção da atividade (BRENA & BATISTA-VIEIRA, 2006; KHAN & ALZOHAIY, 2010).

No mercado já existem enzimas imobilizadas aplicadas a processos industriais como a imobilização de glicose isomerase para a produção de xarope de frutose enriquecido ou a utilização de lactase imobilizada no processo de remoção de lactose do leite, entre outras (KATCHALSKI-KATZIR, 1993).

1.4.2.1. Suportes de ligação iônica

Os suportes iônicos promovem ligações com as regiões carregadas da enzima, e são classificados em catiônicos (carregados negativamente) (figura 3A) ou aniônicos (carregados positivamente) (figura 3B).

Figura 3: Esquema ilustrativo de suportes (A) aniônico e (B) catiônico.

Exemplos de suportes iônicos são as resinas cromatográficas de troca iônica que também podem ser utilizadas como suportes para imobilização. As condições utilizadas para este tipo de técnica nem sempre serão as melhores condições de atividade catalítica da enzima, sendo este um dos pontos de desvantagens deste tipo de suporte. No processo industrial o meio no qual este suporte encontrar-se-ia deve seguir características como pH específico e força iônica baixa para que não haja desligamento da enzima, além destes cuidados deve-se observar se o produto obtido está carregada de modo a competir com a enzima pelo suporte, assim o processo se tornaria inviável (ARROYO, 1998; PESSELA et al, 2003; BRENA & BATISTA-VIEIRA, 2006)

As principais vantagens desta classe de suportes além da reutilização já afirmada anteriormente há também a diminuição de resíduos liberados durante o processo de produção e o protocolo de imobilização é mais simples e fácil de realização e reprodução (PESSELA et al, 2003). Exemplos de suportes amplamente discutidos e utilizados são o DEAE-agarose (aniônico), suportes aminados como o MANAE-agarose (aniônico) e PEI (catiônico).

1.4.2.2. Suportes de ligação covalente

Este tipo de ligação ocorre entre o grupamento químico do suporte e nucleófilos das proteínas, principalmente os aminoácidos lisina, cisteína, tirosina e histidina, sendo os aminoácidos de caráter hidrofóbico descartados deste tipo de ligação por não estarem expostos na superfície proteica. As vantagens são a manipulação dos derivados (enzima-suporte) é mais simples, a carga da enzima permanece constante, após o processo de imobilização, não há restrição quanto ao tipo de reator a ser utilizado no processo industrial e estabilização da estrutura terciária da enzima, portanto mais eficaz (ARROYO, 1998). A principal desvantagem apresentada pela utilização deste tipo de suporte ocorre no processo de imobilização da enzima, onde as condições do meio reacional tem condições extremas (pH básico, força iônica, utilização de agentes redutores entre outros), o que pode levar à desnaturação ou modificações conformacionais e consequentemente perda da atividade.

Outro fator importante a ser considerado neste tipo é a rigidez da ligação entre suporte-enzima, quando há ligação multipontual (glioxil, epóxi e glutaraldeído) a possibilidade de melhorar a estabilização é maior que quando a ligação é unipontual (bromocianógeno) (MATEO et al, 2007).

Como já descrito anteriormente existem diferentes aplicações para as peptidases de forma geral, e em busca da diminuição de custo, facilitação e aumento no rendimento no processo industrial. Existem diferentes processos de estabilização de enzimas a fim de melhorar sua atuação ou ainda direcionar seu sítio ativo, além de possível reaproveitamento dessa enzima. No presente trabalho foram realizados dois experimentos distintos de estabilização, a microencapsulação por secagem em Spray dryer a partir do extrato fermentado proveniente do BFSd e a imobilização em suportes inertes utilizando o extrato fermentado do BFSm.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar parâmetros dos bioprocessos fermentativos para produção de peptidases pelo fungo *Aspergillus terreus*, caracterizar os extratos enzimáticos produzidos e promover estabilidade da enzima utilizando a técnica de microencapsulação por *spray drying* e imobilização em suportes inertes.

2.2. Objetivos específicos

- Estudar bioprocessos fermentativos em estado sólido e submerso do fungo *Aspergillus terreus*:
 - *Variações: meios de cultivo, tempo de fermentação, temperatura, concentração de esporos, pH do meio e umidade. Identificação dos melhores parâmetros de fermentação para a síntese de peptidases.*
- Purificar as peptidases obtidas a partir do BFSd utilizando processos cromatográficos.
- Estabilização das enzimas produzidas por BFSd e BFSm através de microencapsulação por *spray drying* e imobilização em suportes inertes, respectivamente, para estudos de estabilidade e uso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Na figura 4 mostra uma visão geral das metodologias utilizadas para realização deste trabalho.

Figura 4: Fluxograma geral das etapas de metodologia realizadas neste estudo.

3.1. Microrganismo e manutenção

A cepa do fungo *Aspergillus terreus* está depositada no banco de cultura do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. O fungo foi isolado de uma amostra de pena do solo. O material é proveniente da região de sítio, localizado em Miguelópolis-SP. A cepa foi isolada em meio “potato dextrose agar” (PDA) e selecionada em estudos prévios de produção de peptidase em placa de petri contendo ágar adicionado de caseína a 1%. A cepa foi encaminhada para o Centro de Ciências do Departamento de Micologia da Universidade Federal do Pernambuco-UFPE sob a responsabilidade da Profa. Dra. Cristina Maria S. Motta para identificação morfológica e bioquímica, sendo o laudo conclusivo para determinação da cepa *Aspergillus terreus*. A cepa foi mantida em

meio *Potato Dextrose Agar* (PDA) e repicada regularmente em tubos de ensaio, incubados em estufa bacteriológica por um período de 7 dias na temperatura de 30°C (culturas de trabalho).

Para realização dos bioprocessos fermentativos repiques foram realizados a partir das culturas de trabalho em tubos de ensaio com meio de cultura PDA, e mantidos a 30°C por 5 dias.

As cepas do banco são mantidas a 4°C em meio PDA, contidos em tubos de ensaio.

3.2. Bioprocessos Fermentativos

3.2.1. Bioprocesso Fermentativo em estado Sólido (BFSd)

Adaptada de Lotong & Suwanarit (1985) e Merheb-Dini, et al (2007) a metodologia realizada para este bioprocesso utilizou sacos de polipropileno autoclavável (12x20cm) como recipiente, mola de fio de cobre encapado – com finalidade de promover aeração e tubos rígidos de polietileno de alta densidade (5,0 cm de altura x 2,2 cm de diâmetro) para formação de um gargalo, figura 5.

Figura 5: Esquema de recipiente utilizado em BFSd. **(1)** saco de polipropileno de dimensões 12x20cm; **(2)** mola de fio de cobre encapado; **(3)** tubo rígido de polietileno de alta densidade de dimensões 5,0 cm de altura x 2,2 cm de diâmetro; **(4)** meio fermentativo.

Primeiramente foram realizados testes com composições de diferentes meios de cultura utilizando resíduos agroindustriais (Farelo de trigo, Farelo de algodão e Feno de Alfafa) e também suplementações externas de fontes de nitrogênio (Caseína, albumina, proteína de soja e glúten).

- 5g Farelo de Trigo (FT);
- FT suplementado com 5, 10 e 20% de Caseína ou Albumina;

- 5g de Farelo de Algodão (FA);
- FA suplementado com 5, 10 ou 20% de Proteína de soja, Glúten ou FT;
- 5g de Feno de Alfafa

A estes meios foram adicionado um volume de solução salina ((NH₄)₂SO₄, MgSO₄.7H₂O e NH₄NO₃, na concentração de 0,1% para cada sal) correspondente a 65% de umidade inicial (m/v). Em seguida o material foi autoclavado a 121°C por 15 minutos e posteriormente, inoculado com solução de esporos obtida a partir da adição da raspagem da cultura do fungo adicionada a solução salina autoclavada, esta solução foi diluída e levada a contagem de esporos em câmara de Neubauer, ao final a concentração era resultante a 5x10⁶ esporos/mL do fungo (correspondente a 1x10⁶ esporos/g de meio).

O processo fermentativo foi realizado em um período de 24 a 168 horas, em câmara incubadora (BOD) a 30°C. A cada 24 horas um recipiente era retirado da câmara e adicionado 40mL de água destilada (4°C), essa mistura foi submetida a maceração, filtração em gaze e centrifugação a 5000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato fermentado (EF), foi coletado para a quantificação das atividades enzimáticas.

Após a determinação do melhor resíduo agroindustrial para a produção de peptidases, outros parâmetros de cultivo foram variados a fim de delinear as melhores condições de produção desta enzima:

- Variação de esporos: 5x10⁶; 2,5x10⁶ e 1,0x10⁶ esporos/mL;
- Variação de temperatura: 30°C, 35°C, 40°C e 45°C;
- Variação de umidade inicial: 65%, 75%, 85%, 100% (m/v).

3.2.2. Bioprocesso Fermentativo em estado Submerso (BFSm)

O BFSm foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250mL e teve como meio base somente sais inorgânicos (KH₂PO₄ 0,7%; K₂HPO₄ 0,2%; MgSO₄ 0,01%; NaCl 0,5%), modificado de Tran & Nagano (2002). Inicialmente houve a determinação da melhor composição do meio de cultura variando primeiramente fonte de nitrogênio Peptona, Extrato de levedura ou Caseína nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0% de. Este meio foi autoclavado a 121°C, 1atm por 15 minutos e posteriormente, inoculado com solução de esporos obtida a partir da adição da raspagem da cultura do fungo adicionada a água autoclavada, esta solução foi diluída e levada a contagem de

esporos em câmara de Neubauer, ao final a concentração era resultante a 5×10^5 esporos/mL do fungo.

Todo o bioprocesso fermentativo foi realizado em Estufa incubadora Shaker em rotação de 120rpm a 30°C. A cada 24 horas um frasco era retirado, e submetido a filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº1 a fim de separar o micélio produzido do extrato fermentado, que foi submetido a determinação de atividade enzimática. O micélio coletado foi mantido em estufa a 45°C até obter peso constante para posterior análise comparativa entre crescimento e atividade enzimática.

Após a escolha da melhor fonte de nitrogênio, a etapa seguinte foi a seleção da melhor fonte de carbono glicose, frutose ou sacarose como suplemento ao meio já escolhido, nas concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0%.

Uma vez determinada a melhor condição do meio de cultura, outros parâmetros também foram variados:

- Variação de esporos: $1,0 \times 10^5$; $2,5 \times 10^5$; 5×10^5 e $1,0 \times 10^6$ esporos/mL;
- Variação de pH inicial: 6,0; 6,5; 7,0; 7,5 e 8,0;
- Variação de temperatura: 30°C, 35°C e 40°C;
- Efeito da aeração: Frasco Erlenmeyer padrão e haletado, Figura 6.

Figura 6: Erlenmeyer haletado (A) e padrão (B) utilizados no bioprocesso fermentativo submerso para promoção da aeração do meio pela agitação em shaker a 120 rpm.

3.3. Ensaio de atividade proteolítica – Substrato caseína

A atividade proteolítica foi verificada através dos protocolos descritos por Sarath et al, (1996) com modificações. Estas mudanças foram realizadas no preparo do substrato, o autor descreve que a caseína deve ser feita adicionando hidróxido de

sódio, porém o substrato utilizado no presente ensaio é um reagente que já possui em sua composição o sódio (Casein sodium salt from bovine milk, Sigma Aldrich) facilitando sua solubilização em água. Também modificações em relação aos volumes de reação foram realizadas, não sendo necessária a utilização de volumes grandes de reação como relatado pelos autores.

O ensaio utilizado para atividade do extrato fermentado (EF) e para as frações eluídas dos processos cromatográficos foi realizado com a utilização da caseína a 1% dissolvida em tampão fosfato de sódio monobásico 50mM pH 6,5 apropriado para a detecção de atividade proteolítica. Os volumes utilizados neste ensaio foram 150µL de EF, 100µL de tampão fosfato de sódio monobásico 50mM pH 6,5 e 1000µL de Caseína 1%, estes foram incubados por 60 minutos a 40°C, depois deste tempo a reação foi interrompida com 600µL TCA (Ácido Tricloroacético) 10% (nos tubos brancos o TCA foi adicionado antes da caseína afim de promover a precipitação da enzima presente no meio), estes foram centrifugados por 15 minutos a aproximadamente 10.000xg em temperatura ambiente. Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos usando cubetas de quartzo contra seus respectivos brancos em 280nm, em espectrofotômetro.

Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de $0,001A_{280nm}$ dentro das condições de reações usando caseína como substrato (SARATH et al, 1996).

3.4. Ensaio de atividade proteolítica para caracterização parcial – substrato Azo-caseína

Azo-caseína é um derivado cromogêneo da caseína que facilita na solubilização do substrato pela adição do grupo sulfonamida, além de promover uma cor alaranjada ao reagente. Quando hidrolisada por peptidases o substrato libera pequenos componentes coloridos solúveis na presença de TCA, sendo possível a leitura espectrofotométrica na região do visível 440nm (CHARNEY & TOMARELLI, 1947; SARATH et al, 1996).

O protocolo de atividade com azo-caseína como substrato foi baseado no ensaio realizado por Sarath e colaboradores (1996) com modificações na concentração de substrato e volumes de reação. O extrato precipitado foi caracterizado por pH ótimo, temperatura ótima, inibidores, íons e estabilidade em

diferentes pH e temperaturas. Para caracterização do pH ótimo do precipitado o ensaio foi realizado com azo-caseína 1% como substrato, preparada em tampões na faixa de 4,5 a 10,5 com incrementos de 0,5 (Acetato, pH 4,5 – 5,0; MES, pH 5,5 – 6,5; HEPES, pH 7,0 – 8,0; BICINE, pH 8,5 – 9,0; e CAPS, pH 9,5 – 10,5). Os volumes utilizados neste ensaio foram 100µL de extrato enzimático, 100µL de tampão adequado ao pH desejado e 200µL de Azo-caseína 1%, estes foram incubados por 10 minutos a 40°C, depois deste tempo a reação foi interrompida com 800µL TCA(Ácido Tricloroacético) 10% (nos tubos brancos o TCA foi adicionado antes da azo-caseína afim de promover a inativação da enzima presente no meio). Estes foram centrifugados por 15 minutos a aproximadamente 10.000xg em temperatura ambiente. Então foram coletados 800µL de sobrenadante e adicionados 933µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M aos tubos testes, que foram lidos usando cubetas de plástico contra seus respectivos brancos em 440nm, em espectrofotômetro.

A partir da determinação do pH ótimo, a temperatura ótima foi avaliada na faixa de 30°C a 70°C, com intervalos de 5°C. Os ensaios foram realizados da mesma forma como descrita acima, porém utilizando o pH selecionado como ótimo (tampão MES pH 6,5 100mM para o extrato proveniente do BFSd e tampão HEPES pH 7,0 100mM para extrato do BFSm).

Uma vez determinado o pH e a temperatura ótimos, esta condição foi utilizada para realização dos ensaios enzimáticos de inibidores (Fenil metil sulfonil fluoridro - PMSF, ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA e Ácido Iodoacético) e íons (Sódio, Magnésio, Manganês, Cobalto, Cálcio, Potássio, Zinco, Lítio, Cobre, Bário e Alumínio). Porém antes de realizá-lo foi necessário que 100µL do extrato enzimático fosse incubado com 10µL dos inibidores/íons (Solução estoque a 100mM, ao final a concentração estava a 10mM) em banho-maria na temperatura selecionada como ótima (55°C para ambos bioprocessos) por 5 minutos, dando sequência ao ensaio enzimático já citado. Este tempo de exposição não comprometeria o resultado final, uma vez que o tubo controle também foi exposto às mesmas condições sem a presença de íons.

Os ensaios de pH de estabilidade foram realizados com a incubação prévia do extrato enzimático ao volume de 50uL dos tampões a serem analisados a 100mM no pH de 4,5 a 10,5, por 1 hora de incubação a 25°C. Para a realização do ensaio foram adicionados mais 50uL do tampão MES pH 6,5 150mM (BFSd) e HEPES pH

7,0 150mM (BFSm) assim prosseguindo a reação enzimática já descrita anteriormente.

Os testes de estabilidade de temperatura foram realizados com a incubação prévia do extrato enzimático nas temperaturas de 30 a 70°C por 5, 15, 30 e 60 minutos. Prosseguindo o ensaio como descrito anteriormente.

Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de 0,001A_{440nm} dentro das condições de reações usando caseína como substrato (SARATH et al, 1996).

3.5. Purificação

3.5.1. Precipitação de proteínas

Os extratos fermentados obtidos pelos bioprocessos fermentativos foram submetidos ao fracionamento nas proporções de 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4, de EF e etanol 92,6°GL, respectivamente até a determinação da proporção ideal para a precipitação e concentração da peptidase, a fim de caracterizar parcialmente os extratos. O material foi mantido a -20°C por 24 horas, em seguida foi realizada uma centrifugação a 10.000xg por 30 minutos a 4°C para que ocorra a sedimentação da enzima já precipitada. Os sobrenadantes foram descartados, os precipitados foram ressuspensos em tampão e pH adequado através de leve agitação a 4°C, este extrato foi determinado extrato precipitado, este foi submetido a ensaio enzimático para a detecção da presença ou ausência da peptidase.

3.5.2. Filtração tangencial

A filtração tangencial foi utilizada a fim de concentrar o extrato fermentado proveniente do BFSd, pelo do equipamento FlexStand Benchtop System acoplado a um cartucho com membrana de corte 10kDa Hollow Fiber Cartridge Modelo UFP-10-E-3MA.

3.5.3. Cromatografia por exclusão de massa e de troca iônica

A purificação da enzima deu-se pelo seguinte protocolo:

1. Extrato fermentado (BFSd) foi submetido a filtração tangencial;
2. Extrato concentrado foi precipitado com etanol 92,6°GL;

3. O extrato resultante dessas etapas foi então submetido a uma gel filtração em coluna de dimensões 100 x 4 cm preenchida com resina Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 acrescido de 50mM de NaCl. Foram aplicados 2mL do extrato precipitado proveniente do BFSd e eluídas no mesmo tampão de equilíbrio. A vazão de eluição foi ajustado para aproximadamente 0,63 mL/min com auxílio de bomba peristáltica sendo coletadas frações de 5mL por tubo utilizando coletor de frações.
4. As frações com atividade obtidas a partir da gel filtração foram reunidas (80mL) e dialisadas em membrana com poro de 10 kDa para retirada de sal contra 2L de tampão Tris-HCl 30mM pH 8,0 a 4°C, com 2 trocas de tampão para retirada do sal presente nas amostras;
5. Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Tricorn™ 10/50 com resina Source™ 15Q (aniônica) acoplado em AKTA purifier CU 950. A coluna primeiramente foi equilibrada com tampão Tris-HCl 30mM pH 8,0. A amostra foi aplicada e em seguida, foi realizado a etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio, somente após esta etapa, iniciou o gradiente salino linear com a concentração crescente de NaCl de 0 a 200mM. O eluído foi coletado em tubos de ensaio (frações de 5 a 2mL) com auxílio de coletor de frações. Foi realizado o ensaio de atividade proteolítica com substrato caseína.

3.5.4. Determinação de proteínas totais

Após realização dos processos cromatográficos foi determinada a concentração de proteínas totais de cada etapa, desde a produção até a purificação da peptidase, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando BSA (Soro albumina bovina) para confecção da curva padrão.

3.5.5. Avaliação do grau de pureza

A pureza da peptidase obtida a partir da cromatografia de troca iônica foi certificada por gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) 12%, segundo Laemmli (1970) e coradas com nitrato de prata (SEE; JACKOWSKI, 1989). A massa da peptidase foi estimado através do *software* Image Lab™ version 3.0.

3.6. Microencapsulação

Os experimentos de microencapsulação foram realizados em colaboração com Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas do Laboratório de Física Industrial da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – Brasil.

Para a realização dos experimentos de microencapsulação, o material utilizado foi o extrato fermentado do BFSd.

Foram realizados ensaios preliminares de secagem a 50°C, vazão de líquido 5mL/min e proporção de adjuvante 50%, a fim de determinar o adjuvante mais adequado, analisando melhor rendimento e manutenção de atividade proteolítica. Os experimentos foram feitos com os adjuvantes Dextrina, Maltodextrina, Manitol, Dióxido de silício coloidal, Carboximetilcelulose (CMC) e somente o Extrato fermentado (controle).

Para calcular a proporção de cada mistura, foi efetuada a análise do teor de sólidos totais do EF (0,79%) por balança analisadora de umidade com lâmpada de halogênio (Ohaus MB 45). O volume de líquido do EF foi utilizado conforme o valor correspondente (em gramas) necessário para cada obter a proporção determinada para cada experimento.

Após os experimentos preliminares o adjuvante selecionado para a utilização de planejamento experimental através da ferramenta de delineamento Box-Behnken, para otimização de resultados com três fatores e três níveis, que permite a determinação do efeito de interação entre os fatores.

Os fatores escolhidos foram proporção extrato fermentado/adjuvante (EE/Ad), temperatura de saída (Ts) e vazão de alimentação (VA)(Tabela 1).

Tabela 1. Desenho experimental para microencapsulação do extrato fermentado produzido pelo fungo *Aspergillus terreus* em bioprocesso fermentativo em estado sólido.

Experimentos	Níveis Fatoriais Codificados			Níveis Fatoriais Não Codificados		
	Ts (°C)	Vliq (mL/min)	EF/Ad	Ts (°C)	Vliq (mL/min)	EF/Ad
1	-1	-1	0	50	1	1:1
2	1	-1	0	90	1	1:1
3	-1	1	0	50	9	1:1
4	1	1	0	90	9	1:1
5	-1	0	-1	50	5	1:2
6	1	0	-1	90	5	1:2
7	-1	0	1	50	5	3:2
8	1	0	1	90	5	3:2
9	0	-1	-1	70	1	1:2
10	0	1	-1	70	9	1:2
11	0	-1	1	70	1	3:2
12	0	1	1	70	9	3:2
13	0	0	0	70	5	1:1
14	0	0	0	70	5	1:1
15	0	0	0	70	5	1:1

As condições operacionais padrão utilizadas na microencapsulação podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2. Condições iniciais de secagem do extrato fermentado ajustadas no equipamento de spray dryer modelo MSD 0.5 Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil.

Parâmetros	Valores
Vazão do ar de secagem	2,75 m ³ /min
Vazão do ar de atomização	50 L/min
Pressão do ar de atomização	4,5 kgf/cm ²

Com os pós obtidos foram realizados testes de rendimento e atividade proteolítica para determinação do tempo zero de cada experimento, além também de testes de estabilidade de 30, 60 e 120 dias a temperatura ambiente e 4°C.

A análise de resultados foi realizada com o auxílio do *software* Minitab 14.0 com nível de significância de $p = 0,05$.

3.6.1. Estabilidade das micropartículas

A avaliação da estabilidade das peptidases das micropartículas produzidas através da técnica de *spray drying* foi realizada com a exposição às temperaturas de 4°C ou 25°C, durante os seguintes períodos de dias 0, 15, 30, 60, 90 e 180. Os pós foram alíquotados de forma ideal para cada ensaio, eles foram armazenados em tubos de polipropileno de 2mL, devidamente lacrado. Além disso, o extrato utilizado para o processo também foi submetido às mesmas condições, com o objetivo de avaliar a estabilidade das micropartículas frente ao extrato bruto e frente ao tempo de armazenamento. Para isso, passado os dias que haviam sido determinados para a avaliação, as micropartículas foram ressuspensas, mantendo a concentração inicial, ou seja, do extrato bruto, e foram submetidas ao ensaio de avaliação de atividade proteolítica conforme o item 3.6 e quantificação das proteínas totais conforme descrito por Bradford (1976).

3.7. Imobilização em suportes inertes

Os experimentos de imobilização em suportes inertes foram realizados em parceria com Dr. Benevides Costa Pessela, no Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) pertencente ao Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) e à Universidad Autónoma de Madrid (UAM), localizado na cidade de Madrid – Espanha.

A matéria-prima imobilizada foi o extrato fermentado proveniente do BFSm após uma diálise com tampão fosfato monobásico 5mM pH 7,0, devido a presença de sais no meio bruto inicial que poderiam interferir nas interações com os suportes principalmente aqueles de adsorção iônica, denominado extrato fermentado dialisado (EFDi).

Além de dialisado este extrato foi submetido a um estudo de estabilizantes, uma vez que o processo de imobilização pode ser agressivo a estrutura da proteína. Os estabilizantes analisados Trealose, PEG 4000 e Glicina estavam em duas concentrações distintas, 25 e 50%. O ensaio ocorreu com a incubação de 20mL de EBDi a temperatura ambiente sob agitação, foram então dosadas no tempo zero, 15, 30, 60 e 240 minutos para determinação do melhor estabilizante. Os testes de imobilização subsequentes foram realizados com o EBDi adicionado de Glicina 25%.

A atividade proteolítica foi obtida através do protocolo utilizando a azo-caseína como substrato, já citado (CHARNEY & TOMARELLI, 1947; SARATH et al, 1996). Durante os períodos específicos de imobilização de cada suporte foram retiradas alíquotas da suspensão e do sobrenadante e então realizada a atividade proteolítica para determinação da porcentagem imobilizada.

3.7.1. Suportes de adsorção iônica – Ativação e processo de imobilização de enzimas

3.7.1.1. DEAE – agarose

DEAE-agarose é um suporte aminado comercial já ativado.

O processo de imobilização em suporte DEAE foi feito com a utilização de 5mL de EFDi e 5mL de tampão fosfato monobásico 5mM pH 7,0 adicionado a 1g de suporte. Esta mistura foi agitada em agitador basculante de rolos durante uma a duas horas, sendo coletados nestes dois períodos alíquotas para determinação da atividade proteolítica. Uma vez determinada a porcentagem imobilizada a mistura foi filtrada e então o derivado (complexo enzima-suporte) foi recuperado. A interação entre enzima-suporte está ilustrada pela figura 7.

Figura 7: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte iônico DEAE-agarose, onde o suporte é carregado positivamente e liga-se a porção da enzima carregada negativamente.

3.7.1.2. MANAE – agarose

O preparo do suporte manae é feito a partir do processo da inserção de aminas no suporte glioxil (protocolo de ativação abaixo – suporte covalente).

Para aminorar o suporte utiliza-se uma proporção de 1g de suporte glioxil para 10mL de etilendiamina 2M pH 10,0, esta mistura deve permanecer por duas horas sob agitação em agitador de pás.

Como etapa final é utilizada solução de borohidreto de sódio (NaBH_4) na concentração de 10mg/ml em tampão bicarbonato 0,1M pH 10 para redução e formação final do suporte, na proporção 1g /10mL. Agitar por duas horas em agitador de pás a frio. Lavar com tampão acetato de sódio 100mM pH 4,0 até que deixe de borbulhar o NaBH_4 , após esta etapa o suporte deve ser lavado com tampão borato de sódio 100mM pH 9,0. E então lavar com água, todas as lavagem são realizadas utilizando um auxílio de um sistema formado por um funil de Buchner, kitasato e bomba a vácuo. O suporte pronto pode ser armazenado em geladeira com hidratação periódica (FERNANDEZ-LAFUENTE et al, 1993)

O processo de imobilização em suporte MANAE-agarose foi feito da mesma forma que o suporte DEAE-agarose uma vez que ambos são suportes de adsorção aniônica e está ilustrado de acordo com a figura 8.

Figura 8: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte iônico MANAE-agarose, onde o suporte é carregado positivamente e liga-se a porção da enzima carregada negativamente.

*Fonte: Fernandez-Lafuente et al, 1993.

3.7.2. Suportes covalentes - Ativação e processo de imobilização de enzimas

3.7.2.1. Bromocianógeno

Mantido em geladeira, ativado no mesmo dia de uso.

Adicionar a 1,5g de suporte bromocianógeno (CNBr), 50mL de água destilada pH 2-3 durante trinta minutos a uma hora em agitador de rolos, esta mistura é filtrada e lavada a vácuo utilizando um sistema formado por um funil de Buchner, kitasato e bomba a vácuo (PALOMO, 2003).

Uma vez ativado 1g do suporte foi adicionado a 5mL de EFDi e 5mL de tampão fosfato monobásico 5mM pH 7,0, esta mistura foi agitada em agitador basculante de rolos por volta de quinze a trinta minutos, sendo realizada a atividade proteolítica a fim de determinar a porcentagem imobilizada. Posteriormente foi filtrada e lavada uma a duas vezes com solução de etanolamina 1M pH 8,0 (1g de suporte para 10mL de solução) com auxílio do sistema formado por um funil de Buchner, kitasato e bomba a vácuo. Após esta etapa o derivado foi incubado com a mesma solução de etanolamina por uma hora e trinta minutos em agitador basculante de rolos, logo foi lavado e filtrado com água destilada, assim a enzima estava imobilizada (figura 9).

Figura 9: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Bromocianógeno; grupo reativo do suporte: imido carbonato/ grupo reativo da enzima: região amino terminal e/ou aminas de baixo pKa. *Fonte: Palomo, 2003.

3.7.2.2. Glioxil – agarose

Este suporte tem como origem o suporte base agarose comercial, que foi lavada em abundância até eliminar o odor de etanol.

Para criar glioxil foram utilizados 10g de agarose e adicionados a este 0,72mL de periodato de sódio diluído em 142,8mL de água destilada, mantendo em agitação suave em agitador de pás durante uma hora e trinta minutos, e então lavar o suporte com água (GUISAN, 1987).

Uma vez ativado a imobilização da enzima ocorre com a utilização de 1g de suporte adicionados a 5mL de EFDi e 5mL de tampão bicarbonato de sódio 100mM pH 10,0 adicionados a 50% de glicina. Esta mistura foi mantida sob agitação em agitador basculante de rolos por volta de uma a duas horas, sendo realizada a atividade proteolítica a fim de determinar a porcentagem adsorvida ao suporte. Uma vez adsorvida a etapa seguinte foi o passo da redução, na qual há a formação da ligação covalente pela adição de 8,9mg de borohidreto de sódio. Essa mistura foi mantida sob agitação a frio e destampada para liberação de hidrogênio durante 10 a 15 minutos. Logo o derivado foi lavado com auxílio do sistema formado por um funil de Buchner, kitasato e bomba a vácuo (Figura 10).

Figura 10: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Glioxil-agarose; grupo reativo do suporte: aldeído alifático/ grupo reativo da enzima: amina das lisinas. *Fonte: Palomo, 2003.

3.7.2.3. Epóxido – agarose

Primeiramente foi preparada uma solução composta por 6,56g de hidróxido de sódio diluídos em 88mL de água destilada, misturá-los até que esfrie. Após a solubilização adicionar 0,4g de Borohidreto de sódio e tão logo incluir 32mL de acetona a essa mistura, a frio. Concomitante ao preparo desta solução foi lavado e pesado 20g de agarose 6BCL, que foi adicionada à solução previamente preparada, mistura realizada em banho de gelo. Com auxílio de funil de separação, foi gotejado lentamente 22mL de epicloridrina e mantido em temperatura ambiente sob agitação suave (agitador de pás) overnight (16 horas). Uma vez terminado o processo, lavar e filtrar o suporte.

A imobilização ocorre com a utilização de 1g do suporte adicionado a 5mL de EFDi e 5mL de tampão fosfato monobásico 5mM pH 7,0, após uma hora filtrar e adicionar ao derivado 10mL de tampão fosfato monobásico 1M pH 7,0 para formação lenta das ligações covalentes com grupamentos epóxi (Figura 11).

Figura 11: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente Epoxi-agarose; grupo reativo do suporte: grupos epóxido/ grupo reativo da enzima: 1) Etapa de adsorção: zona mais hidrofóbica; 2) Etapa covalente: amina das lisinas, hidroxilas da tirosina, serina e SH das cisteínas. *Fonte: Palomo, 2003.

3.7.2.4. Glutaraldeído

A partir do suporte MANAE-agarose podemos também fazer o suporte com Glutaraldeído.

Foram utilizados 10g de MANAE-agarose adicionados a 11,2mL de tampão fosfato 200mM pH 7,0, assim que ocorrer a junção do tampão ao suporte o pH pode sofrer alguma mudança, logo deve-se comprovar o pH e ajustá-lo para 7,0 caso haja alguma alteração. Adicionar 16,8mL de glutaraldeído e comprovar novamente o pH 7,0. Agitar durante doze a quatorze horas com auxílio de agitador basculante de rolos. Lavar abundantemente com água utilizando funil de Buchner, kitasato e bomba a vácuo (FERNANDEZ-LAFUENTE et al, 1993). Utilizá-lo assim que ativado.

O processo de imobilização em suporte Amino glutaraldeído foi feito com a utilização de 5mL de EFDi e 5mL de tampão bicarbonato 100mM pH 7,0 adicionado a 1g de suporte. Esta mistura foi agitada em agitador basculante de rolos durante uma a duas horas, sendo coletados nestes dois períodos alíquotas para determinação da atividade proteolítica. Uma vez determinada a porcentagem imobilizada a mistura foi filtrada e então o derivado foi recuperado (Figura 12).

Figura 12: Esquema ilustrativo de imobilização em suporte covalente amino glutaraldeído; grupo reativo do suporte: aldeídos cíclicos/ grupo reativo da enzima: região amino terminal e/ou aminas de baixo pKa. *Fonte: López- Galego, 2006.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Bioprocesso Fermentativo Sólido (BFSd)

A figura 13 refere-se a um panorama geral do desenvolvimento das condições de meio de cultivo, sendo a primeira etapa realizada com farelo de trigo isolado e com suplementações com caseína e albumina, seguido por ensaios com somente farelo de algodão e suplementado com glúten, proteína de soja e farelo de trigo. E assim com o meio isolado as etapas seguintes foram realizadas.

Figura 13: Esquema geral do Bioprocesso fermentativo sólido quanto ao desenvolvimento das melhores condições de cultivo.

4.1.1. Efeito de fontes de nitrogênio na produção de peptidases em BFSd

O comportamento do fungo *Aspergillus terreus* foi iniciado pela sua produção utilizando os substratos sólidos farelo de trigo (FT), farelo de algodão (FA) e feno de alfafa e a combinação com alguns indutores (Caseína, Albumina, Glúten e proteína de soja). Nas condições utilizadas, a melhor fonte para a produção de peptidase para o fungo *A. terreus* foi 5g FT chegando aos picos de aproximadamente 500U/mL de peptidase em 72 e 120 horas (Figura 14).

Figura 14: BFSd – Influência de diferentes fontes proteicas na produção de peptidases por *A. terreus*. (A) e (B) Somente Farelo de trigo (FT) ou com suplementações de caseína ou albumina; (C), (D) e (E) Somente FT ou Farelo de Algodão (FA) ou com suplementação de farelo de trigo (no caso do FA), glúten ou proteína de soja; (F) Somente FT, FA ou Feno de Alfafa.

Os resultados obtidos demonstraram que a utilização de indutores não se mostrou eficaz quando comparado ao meio com somente o resíduo (5g de farelo de trigo ou farelo de algodão). De acordo com Abidi e colaboradores (2008), a presença de proteínas e indutores no meio afetam a produção e secreção de peptidases. Nas nossas condições de estudo, podemos observar que a suplementação com caseína (Fig. 14A) e albumina (Fig. 14B) afetou de forma negativa a produção de peptidases quando utilizadas com o farelo de trigo. No bioprocessamento utilizando o farelo de algodão, a suplementação não afetou a produção de peptidases de modo significativo quando comparadas ao meio de cultura com 5g de FA somente.

O perfil de produção utilizando 5g de farelo de trigo foi superior ao de 5g de farelo de algodão durante todo o bioprocessamento, além disso, os picos de produção atingiram aproximadamente 500 U/mL (FT) e 50 U/mL (FA). A composição proteica dos substratos não sugere a melhor justificativa para essa observação, uma vez que o farelo de trigo possui cerca de 16,58% de proteínas totais em sua composição e o farelo de algodão 30,76% (FILHO et al, 2001). Sendo assim, a disparidade na produção de enzimas observada pode ser proveniente de uma diferença entre os tamanhos de partícula, uma vez que pode diminuir a acessibilidade ao substrato ou ainda os espaços vazios ocupados pelo oxigênio (KRISHNA, 2005).

4.1.2. Efeito da concentração de esporos na produção de peptidases em BFSd

A concentração de esporos é um fator importante no processo fermentativo, pois pode modular a produção de enzimas no meio devido à disponibilidade de material a ser degradado.

Observa-se pelo perfil de produção, dentro do estudo realizado, que as concentrações de $5,0 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^5$ esporos/g promoveram um aumento significativo na produção de peptidases quando comparada a condição $1,0 \times 10^6$ esporos/g (Figura 15). Desta forma, a concentração de esporos selecionada para a continuação dos experimentos foi de $2,0 \times 10^5$ esporos/g, pois esta condição combina a maior produção de peptidases com a utilização de menos esporos.

Figura 15: BFSd – Influência da concentração de esporos no cultivo e produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT incubado a 30°C.

O aumento da concentração de esporos pode ter ocasionado a exaustão dos nutrientes de forma que não houvesse a necessidade de uma maior produção de peptidases para degradação do substrato, logo com a diminuição da concentração de esporos houve um aumento da produção enzimática. Também pode ter ocorrido a falta de oxigênio, com o grande número de esporos germinados na maior concentração, ocasionando uma menor produção de enzima, por ocasionar a morte celular.

4.1.3. Efeito da temperatura na produção de peptidases em BFSd

A temperatura de cultivo interfere no crescimento e metabolismo do fungo, e como consequência a concentração de peptidase pode ser diferenciada. A melhor temperatura de cultivo demonstrada na figura 16 foi a 30°C, onde se pode observar um perfil de atividade superior durante todo o período do bioprocessamento e três pontos de atividade (72, 96 e 120 horas) de aproximadamente 500 U/mL. Na temperatura de 35°C é possível observar somente um pico de atividade de cerca de 420 U/mL e um perfil decrescente a partir de 96 horas. Os resultados apresentados indicam que a produção enzimática é sensível ao aumento da temperatura, como indicado pelos baixos níveis de atividade proteolítica obtidos a 40 e 45°C. De modo visual, também

observamos uma redução nos níveis de crescimento do fungo nas maiores temperaturas estudadas. O fato de aumentar a temperatura também promove maior evaporação de água do bioprocesso, o que tem como consequência direta a morte celular ou não germinação dos esporos, desta forma a queda na produção e secreção de peptidase é real.

Figura16: Influência da temperatura de cultivo na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT e 1×10^6 esporos/g.

4.1.4. Efeito da umidade inicial na produção de peptidases em BFSd

A umidade inicial presente no meio sólido é proporcional ao teor de água livre e também pode influenciar os níveis de produção de peptidase. Como demonstrado na figura 17, à condição de 75% de umidade inicial proporcionou melhor desempenho e a condição de 65% obteve níveis similares em alguns períodos do bioprocesso. Também podemos observar que o aumento da umidade inicial, nas porcentagens de 85 e 100%, afetou negativamente a produção de peptidases diminuindo a produção de peptidase para quase metade da melhor condição (75%).

Figura 17: Influência da umidade inicial na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultura composto por 5g de FT e 1×10^6 esporos/g, incubado a 30°C.

Os resultados anteriormente observados podem estar associados ao fato que a umidade afeta a porosidade do meio de cultura e, conseqüentemente, pode dificultar a oxigenação do meio e, dessa forma, influencia no crescimento dos fungos e conseqüentemente na produção de peptidases ou outros metabólitos (PANDEY,1992).

Nas condições de estudo abordadas, o pico máximo de produção de peptidase foi de 677 U/mL (5400 U/g de substrato) no período de 72 horas de fermentação, utilizando somente farelo de trigo a 30°C com concentração de esporos de 1×10^6 esporos/g de meio e 75% de umidade. Além disso, diferentes espécies de *Aspergillus* sp em meio semelhante, demonstraram produção de peptidases similar à deste trabalho, chegando a picos de 400 a 800 U/mL, como é relatada por Macchione e colaboradores (2008). Em conjunto, estes dados indicam que o fungo em questão não necessita de uma fonte externa de nitrogênio para produção desta enzima e salientam o seu potencial como produtor de peptidases.

4.2. Bioprocesso Fermentativo Submerso (BFSm)

Na sua totalidade, os fungos apresentam diferentes estratégias para obtenção de nutrientes e também depende das características e variações das fontes de nitrogênio e carbono, pois podem influenciar no tipo e concentração de peptidase.

Na figura 18 é observado um panorama geral do delineamento da melhor condição de cultivo para o fungo *A. terreus*, sendo a primeira etapa a definição da melhor fonte de nitrogênio seguido pela suplementação com fontes de carbono, e uma vez determinado o meio de cultivo as demais condições foram realizadas.

Figura 18: Esquema geral do Bioprocesso fermentativo submerso quanto ao desenvolvimento das melhores condições de cultivo.

4.2.1. Efeito de fontes de nitrogênio na produção de peptidases em BFSm

Para o estudo da influência do tipo de fonte de nitrogênio e suas concentrações foram testadas três orgânicas: Caseína, peptona e extrato de levedura (EL) - e uma inorgânica: Sulfato de amônio (SA). Os bioprocessos fermentativos submersos que utilizaram como fontes de nitrogênio caseína e peptona obtiveram picos de produção semelhantes de 147 U/mL (0,5% de Caseína) e de 140 U/mL (0,5% de Peptona), ambos no período de 120 horas (Figura 19).

Embora os picos de produção tenham sido similares, os perfis de produção foram diferentes entre as duas variações, pois enquanto a peptona 0,5% entra em decréscimo a partir de 144 horas, a caseína mantém bons níveis neste mesmo período e uma tendência ascendente de produção. Além disto, a caseína é uma fonte mais complexa quando comparada à peptona, que já é produto de hidrólise, e por esse motivo pode proporcionar uma produção mais variada de enzimas (Figura 19).

Desta forma a fonte de nitrogênio selecionada para as seguintes etapas foi a Caseína na concentração de 0,5% em função de seu perfil de produção satisfatório, das características intrínsecas e do custo do substrato.

Figura 19: Influência na produção de peptidases por *A. terreus* de diferentes fontes de nitrogênio em três diferentes concentrações e controle. (A) Caseína; (B) Peptona; (C)*EL – Extrato de levedura; (D)**SA – Sulfato de amônio.

Não foi observado nível expressivo de atividade proteolítica nos experimentos com a fonte inorgânica de Sulfato de amônio em nenhuma concentração testada, assim como no controle (0,7% Fosfato de potássio monobásico, 0,2% Fosfato de potássio bibásico, 0,5% Cloreto de Sódio e 0,1% Sulfato de magnésio) (Figura 19).

4.2.2. Efeito de fontes de carbono na produção de peptidases em BFSm

Após o delineamento da melhor fonte de nitrogênio foram realizados experimentos com variações de três fontes de carbono (Glicose, Frutose e Sacarose). A concentração de 0,5% de caseína é o meio padrão ao qual foram adicionadas as diferentes concentrações das fontes de carbono. Os resultados obtidos demonstraram uma modulação negativa por todas as concentrações estudadas de Glicose, Frutose e Sacarose em relação ao meio controle com 0,5% de caseína (Figura 20).

Figura 20: Influência na produção de peptidases por *A. terreus* de diferentes fontes de carbono em quatro diferentes concentrações e controle. (A) Glicose; (B) Frutose; (C) Sacarose.

Resultados similares foram observados por Abidi e colaboradores (2008) que também relataram uma diminuição na produção de peptidases por *Botrytis cinerea* quando adicionada fonte de carbono.

4.2.3. Efeito da concentração de esporos na produção de peptidases em BFSm

A concentração de esporos modula positiva e negativamente a produção de enzimas de acordo com a degradação e disponibilidade de substrato no meio, além de outros parâmetros do processo, como por exemplo, a aeração do meio.

Na figura 21 é possível observar que a melhor produção global de peptidases foi obtida com a maior concentração $1,0 \times 10^6$ esporos/mL e que o pico de atividade

de cerca de 150 U/mL foi obtido com a concentração de $5,0 \times 10^5$ esporos/mL e 120 horas de fermentação.

Figura 21: BFSm – Influência da concentração de esporos no cultivo e produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*.

Diferentemente do que aconteceu no BFSd, a produção de peptidases no BFSm demonstrou melhor desempenho com uma concentração maior de esporos. Além disso, a tendência ascendente de atividade proteolítica em todas as concentrações de esporos estudadas indica que o meio dispunha de condições para a produção enzimática após 168 horas de fermentação.

4.2.4. Efeito do pH e temperatura na produção de peptidases em BFSm

Após a determinação das melhores condições de suplementação com fontes de nitrogênio e carbono e concentração de esporos foi realizado o estudo da influência do pH e da temperatura na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*. A temperatura e o pH são parâmetros que interferem no crescimento e metabolismo do fungo e que, conseqüentemente, pode influenciar a produção de peptidase.

Na figura 22A é possível observar que o melhor perfil geral de produção foi obtido quando o pH inicial do meio foi 6,0 e o pico de produção de aproximadamente 150 U/mL foi obtido a partir de 144 horas de fermentação. Em relação a temperatura de incubação, a figura 21B mostra que o melhor nível de produção foi obtido a 35°C e o pico de produção de aproximadamente 200 U/mL foi obtido após 48 horas de fermentação. O cultivo a 35°C além de promover uma produção acumulada maior,

proporcionou um adiantamento no pico de produção quando comparado com os índices do cultivo a 30°C.

Figura 22: BFSm - Influência do pH e temperatura de cultivo na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultivo composto por sais inorgânicos e 0,5% de caseína.

Na figura 22 nota-se que o aumento da alcalinidade do meio (figura 22A) e que a maior temperatura (40°C) reduziram os níveis de produção de peptidases.

Nas condições do estudo, o pico máximo de produção de peptidase foi de aproximadamente 200 U/mL no período de 48 horas de fermentação, utilizando meio suplementado com 0,5% de Caseína, na concentração de 1×10^6 esporos/mL de meio em pH 6,0 e na temperatura de 35°C. Os níveis de produção obtidos em BFSm neste estudo são animadores, uma vez que outros autores detectaram um pico de produção de peptidase de 1U/mL por *A. terreus* em fermentação submersa, utilizando um meio com 0,5% de extrato de carne e 1% de Glicose (Chellapandi et al., 2010).

4.2.5. Efeito da aeração na produção de peptidases em BFSm

Após a determinação das melhores condições de pH e temperatura de cultivo foi realizado o estudo da influência da aeração do meio na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*.

Figura 23: BFSm - Influência da aeração de cultivo na produção de peptidases pelo fungo *A. terreus*, em meio de cultivo composto por sais inorgânicos e 0,5% de caseína.

A promoção de melhor aeração ao meio de cultivo manteve o mesmo perfil de produção, porém não houve superação da produção no cultivo com recipiente padrão.

Nas condições do estudo, o pico máximo de produção de peptidase foi de aproximadamente 360 U/mL no período de 72 horas de fermentação, utilizando meio suplementado com 0,5% de Caseína, na concentração de 1×10^6 esporos/mL de meio em pH 6,0 e na temperatura de 35°C. Os níveis de produção obtidos em BFSm neste estudo são animadores, uma vez que outros autores detectaram um pico de produção de peptidase de 1U/mL por *A. terreus* em fermentação submersa, utilizando um meio com 0,5% de extrato de carne e 1% de Glicose (Chellapandi et al., 2010).

4.3. Caracterização bioquímica do Extrato precipitado - BFSd X BFSm

Os experimentos de caracterização da atividade proteolítica do extrato enzimático precipitado da fermentação sólida foram realizados, a fim de avaliar as características bioquímicas desta peptidase e seu potencial de hidrólise enzimática.

4.3.1. Determinação do pH ótimo

As enzimas apresentam efeitos estruturais pela variação de pH, mudanças deste fator podem alterar a estrutura da enzima devido à protonação e

desprotonação de resíduos de aminoácidos. O efeito de protonação e desprotonação do sítio catalítico de uma enzima refletem seu pH ótimo (TIPTON et al, 2009). Neste estudo foi utilizado azo-caseína como substrato entre o intervalo de pH de 4,5 a 10,5. Os picos de atividade dos bioprocessos fermentativos foram atingidos nos pH 6,5 e 7,0, para o BFSd (figura 22A) e BFSm (figura 22B) respectivamente. Ambos bioprocessos demonstraram amplitude de atividade em faixa de pH entre 5,5 e 8,5. A queda de atividade ocorreu após o pH 8,5 em BFSd e 10,0 em BFSm, evidenciando uma tolerância a pH mais alcalinos do extrato proveniente do bioprocessos submerso. Esta queda deve-se provavelmente pela protonação de alguns resíduos do sítio catalítico, modificação estrutural que promoveu a desnaturação com queda de atividade ou ainda interferência de outros compostos uma vez que a definição foi realizada com extrato precipitado dos bioprocessos fermentativos, fig. 24.

Figura 24: Influência do pH (faixa 4,5-10,5, com incrementos de 0,5) na atividade enzimática dos extratos fermentados. **(A)** BFSd – pH ótimo **(B)** BFSm – pH ótimo. Ensaios realizados com substrato azo-caseína a 45°C.

4.3.2. Determinação da temperatura ótima

Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da enzima realizou-se a hidrólise da azo-caseína incubadas em diferentes temperaturas, já no pH ótimo. A temperatura ótima de reação foi determinada a 55°C em ambos bioprocessos, como demonstrado na Figura 25. Acima da temperatura de 55°C observamos a queda da atividade proteolítica, possivelmente pela desnaturação da enzima pelo rompimento das ligações químicas promovida pela energia térmica. Abaixo da temperatura ótima, observamos que com o acréscimo da

temperatura ocorre também o aumento da atividade, que relaciona-se com a agitação das moléculas aumentando a colisão da enzima com o substrato promovendo um aumento da formação do produto.

Figura 25: Influência da temperatura (faixa 30-75°C, com incrementos de 5,0) na atividade enzimática. **(A)** BFSd – Temperatura ótima **(B)** BFSm – Temperatura ótima. Ensaios realizados com substrato azo-caseína em pH 6,5 (BFSd) e 7,0 (BFSm).

4.3.3. Estabilidade enzimática a pH e temperatura

A determinação do efeito da temperatura e do pH sobre a estabilidade do extrato enzimático deu-se pela hidrólise da azo-caseína incubadas em diferentes temperaturas e pH. Estes ensaios são de grande importância para certificação da estabilidade da proteína para uma posterior aplicação.

A temperatura na qual o extrato enzimático mostrou maior estabilidade foi de 30°C mantendo a atividade próxima a 50% até uma hora, para BFSd (Figura 26B). E no caso do BFSm (Figura 26C) o comportamento mais estável demonstrado foi no intervalo de 40 a 50°C com atividade enzimática por volta de 50% após uma hora de ensaio.

Na Figura 26A podemos observar o desempenho de ambos extratos frente a uma faixa de pH 4,5-10,5. O extrato do BFSd demonstrou um comportamento de estabilidade maior em pH mais ácido (4,5-6,0), apesar de acontecer uma queda de atividade com o aumento do pH, esta não tem queda abaixo de 50%. Em contrapartida o extrato do BFSm possui um perfil de estabilidade em pH inverso ao anterior uma vez que é mais estável em pH alcalino, mantendo atividade acima de

60% na faixa de pH de 8,0 a 10,0. O perfil de estabilidade em pH pode ser proveniente da presença de diferentes peptidases ou interferentes.

Figura 26: (A) Estabilidade em pH (faixa 4,5-10,5, com incrementos de 0,5) na atividade enzimática, nos períodos de 1 e 24 horas; (B) Estabilidade em temperatura do extrato proveniente do BFSd em tempos de exposição de 5, 15 e 60 minutos; (C) Estabilidade em temperatura do extrato proveniente do BFSm em tempos de exposição de 5, 15 e 60 minutos.

A estabilidade é um parâmetro importante a ser analisado tendo em vista as diferentes aplicações das enzimas e extratos enzimáticos em processos industriais. É a partir destes testes que tais amostras podem se apresentar estáveis a ponto de ser submetidos a processos complexos ou se instáveis podem ser realizados técnicas para estabilizar tais enzimas (AMERI & MAA, 2006; NAMALDI et al, 2006).

4.3.4. Classificação das peptidases

O estudo de inibidores demonstrou que pode haver mais de uma peptidase no extrato enzimático precipitado, uma vez que houve inibição pelo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), e também pelo PMSF (Fenilmetanosulfonilfluorido),

caracterizando assim, uma metalo e serino peptidases, respectivamente. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 27.

Figura 27: Influência da adição de inibidores, na atividade proteolítica de peptidases obtidas pelo fungo *A. terreus* (A) BFSd e (B) BFSm. A atividade proteolítica foi determinada com substrato azo-caseína a 55°C, em tampão MES pH 6,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.

De acordo com Stefanova e colaboradores (1997) o fungo *A. terreus* produz dois tipos de peptidases das classes serino e metalo peptidases responsáveis pela clivagem de endoglucanases de menor massa, que corrobora com os resultados obtidos, porém não descarta outras possibilidades uma vez que os meios de cultivo utilizados foram diferentes.

4.3.5. Efeito de íons sobre a atividade enzimática

A modulação da atividade de uma enzima na presença de íons pode ser positiva - quando ocorrer um aumento da atividade em relação ao controle - ou negativa - queda da atividade em relação ao controle. Os íons podem interagir com a enzima através de seus resíduos no sítio catalítico, modificando sua disposição, consequentemente ativando ou inativando essa enzima. Ou ainda o íon pode interagir com outros aminoácidos da composição da proteína, modificando sua estrutura terciária promovendo ou não a melhoria da atividade.

Conforme observamos, a peptidase contida no extrato precipitado do BFSd apresentou modulação positiva com aumento de 120% e 110% na presença do íon

Ca^{2+} e Al^{3+} , respectivamente. Também observamos uma modulação negativa quando a enzima foi exposta ao lítio e cobre, que possivelmente ligaram-se ao resíduo de serina presente no sítio catalítico da peptidase levando à perda de atividade. Em contrapartida o extrato proveniente do BFSm apresentou um comportamento diferenciado com ativação de quase 200% quando incubada com Co^{2+} e uma ativação discreta quando adicionada a Zn^{2+} , a amostra foi inativada frente ao Ca^{2+} , Ba^{2+} e Al^{3+} (Figura 28).

Hajji e colaboradores (2007) observaram uma modulação positiva quando incubada com íon cálcio (124%) em uma serino peptidase de *Aspergillus clavatus*, desempenho semelhante ao experimento realizado neste estudo.

Figura 28: Influência da adição de íons, na atividade proteolítica de peptidases obtidas do (A) BFSd e (B) BFSm, pelo fungo *A. terreus*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato azo-caseína a 55°C, em tampão MES pH 6,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.

Tabela 3. Informações gerais da caracterização dos extratos de BFSd e BFSm.

Parâmetros	BFSd	BFSm
pH ótimo	5,5 – 8,0	5,5 – 10,0
Estabilidade pH	pH ácidos (4,5-6,0)	pH alcalinos (8,0-10,0)
Temperatura ótima	55°C	55°C
Estabilidade temperatura	≈ 50% (30 e 35°C)	≈ 50% (40 e 45°C)
Inibidores	PMSF e EDTA	PMSF e EDTA
Íons	↑ Al^{+3} e Ca^{+2} ↓ Li^+ e Cu^{+2}	↑ Co^{+2} ↓ Al^{+3} e Ca^{+2}

4.4. Purificação – BFSd

4.4.1. Filtração tangencial

O extrato fermentado foi submetido a um processo de concentração por filtração tangencial com volume inicial de 679mL e volume final de 130mL.

4.4.2. Precipitação por etanol

O extrato enzimático bruto concentrado obtido do processo fermentativo sólido foi submetido ao fracionamento por etanol para determinar a concentração ideal para precipitação da peptidase. O melhor resultado foi obtido na concentração de 1:3 (extrato:etanol), onde a atividade final do extrato precipitado foi 264,71 U/mL.

4.4.3. Cromatografia por exclusão de massa e troca iônica

O Extrato precipitado foi submetido à cromatografia de filtração em gel Sephadex G-50, e teve como perfil de eluição dois picos onde houve atividade proteolítica e um pico sem atividade enzimática o que pode caracterizar a saída de contaminantes da amostra (Figura 29). As frações referentes aos picos com atividade foram submetidos à eletroforese (SDS-PAGE) para acompanhamento da purificação.

Figura 29: Cromatograma da primeira etapa de purificação do extrato precipitado do fungo *A. terreus*. Fonte: Purificação por Gel filtração utilizando coluna cromatográfica com resina Sephadex G-50.

A Figura 30 apresenta os diferentes perfis provenientes da eluição da gel filtração. Onde há a presença de gel com grande quantidade de contaminantes e outros com menos.

Figura 30: Eletroforese SDS-PAGE das frações cromatográficas por gelfiltração Sephadex G-50. **(A)** Frações iniciais (57-62); **(B)** Frações finais (74-79).

Após a certificação da pureza das frações, elas foram divididas em lotes e então submetidas à troca iônica (Coluna aniônica Source 15Q), onde obtivemos o cromatograma a seguir, onde podemos observar o pico de atividade enzimática e outros picos caracterizando a saída de contaminantes. A saída da enzima pura, ocorreu na fração não ligada do processo (Figura 31)

Figura 31: Cromatograma da etapa de troca iônica absorbância x gradiente de sal – 0 – 200mM de NaCl x Atividade enzimática.

A certificação da pureza da enzima proveniente da etapa de troca iônica está representado na figura 32.

Figura 32: Eletroforese SDS-PAGE das frações cromatográficas por troca iônica Source 15Q.

4.5. Microencapsulação

A microencapsulação é um processo que busca conferir maior estabilidade ao produto-alvo. Neste estudo o extrato fermentado gerado do BFSd obteve maiores níveis de produção e foi selecionado para ensaios de microencapsulação. A princípio foram realizados experimentos prévios para determinação de um adjuvante que mantivesse um melhor rendimento e atividade em condições de secagem menos favoráveis (baixa temperatura, vazão e proporção Extrato/adjuvante mediana). A figura 33 demonstra que a maltodextrina mostrou-se mais eficiente que o restante dos adjuvantes para o processo de microencapsulação deste extrato enzimático, mantendo um rendimento e atividade enzimática melhores em comparação ao restante dos adjuvantes.

Figura 33: Estudo prévio para determinação de adjuvantes para posterior experimento por planejamento experimental. **(A)** Rendimento; **(B)** atividade enzimática. *EB – Extrato bruto seco sem adição de adjuvantes.

Em seguida, os experimentos foram executados a partir do planejamento experimental utilizando Box-Behnken. Foram selecionados três parâmetros: Temperatura ($T^{\circ}\text{C}$), Vazão de alimentação (VA) e Proporção de extrato bruto e adjuvante (EB/Ad).

Na tabela 4 estão explicitados os níveis fatoriais codificados e não codificados utilizados no planejamento experimental e os resultados obtidos após a microencapsulação em termos de rendimento do pó e atividade enzimática relativa.

Tabela 4. Percentual de rendimento do processo de microencapsulação da peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus terreus*, em BFSd.

Experimento	Níveis fatoriais codificados			Níveis fatoriais reais			Rendimento (%)	Atividade relativa (%)
	T (°C)	*VA (mL/min)	**EB/Ad	T (°C)	*VA (mL/min)	**EB/Ad		
1	-1	-1	0	50	1	1	44,8	83,1
2	1	-1	0	90	1	1	37,6	75,4
3	-1	1	0	50	9	1	41,7	76,1
4	1	1	0	90	9	1	46,0	72,4
5	-1	0	-1	50	5	0,5	41,6	31,3
6	1	0	-1	90	5	0,5	57,8	30,7
7	-1	0	1	50	5	1,5	37,5	99,3
8	1	0	1	90	5	1,5	40,7	103,4
9	0	-1	-1	70	1	0,5	55,9	50,2
10	0	1	-1	70	9	0,5	46,6	45,5
11	0	-1	1	70	1	1,5	47,6	80,8
12	0	1	1	70	9	1,5	43,3	75,9
13	0	0	0	70	5	1	52,8	49,3
14	0	0	0	70	5	1	58,0	47,3
15	0	0	0	70	5	1	58,2	47,8

*VA: Vazão de alimentação, **EB/Ad: Proporção de extrato e adjuvante. O rendimento do pó foi calculado como a razão de sólidos finais em relação aos sólidos iniciais e o resultado indicado como porcentagem. Atividade enzimática relativa foi determinada comparando a atividade dos experimentos após secagem em relação à atividade enzimática do Extrato bruto (EB) não submetido a secagem, ao qual foi conferida a atividade relativa de 100%.

Como podemos observar os experimentos 6, 9, 13, 14 e 15 foram os que apresentaram rendimentos acima de 50% com valores absolutos de 57,81; 55,9, 52,8; 58,0 e 58,2%, respectivamente. Em contrapartida, os menores rendimentos foram com 37,6 e 37,5% provenientes dos experimentos 2 e 7, respectivamente. Em relação à atividade relativa, os experimentos 7 e 8 demonstraram melhor performance e com atividades proteolíticas similares ao EB.

Os resultados de rendimento e atividade enzimática foram submetidos a análises estatísticas utilizando o *software* Minitab 14.0 com nível de significância de $p = 0,05$. As análises mostraram que as maiores temperaturas proporcionaram os melhores rendimentos (Figura 34A, 34B, tabela 5 e equação 1) de modo independente dos parâmetros VA e EB/Ad. A atividade enzimática ficou condicionada ao parâmetro EB/Ad e também a interação deste mesmo parâmetro à

vazão de líquido (Figuras 34C, 34D, tabela 5 e equação 2), ou seja, quanto maior o EB/Ad maior a atividade enzimática.

Tabela 5. *p* valor referentes a cada resposta desejada.

Termos	<i>p</i> valor Rendimento	<i>p</i> valor Atividade enzimática
Constante	0	0
T°C	0,872	0,012
VA	0,795	0,395
EE/Ad	0,027	0,477
T°C*T°C	0,088	0,207
VA*VA	0,267	0,301
EE/Ad*EE/Ad	0,12	0,641
T°C*VA	0,04	0,274
T°C*EE/Ad	0,996	0,993
VA*EE/Ad	0,691	0,426

$$\text{Rendimento} = 40,5333 + 7,2.X_1 \quad (1)$$

$$\text{Atividade enzimática} = 57,4967 + 10,925.X_1 + 10,925.X_1 13,73.X_3 \quad (2)$$

Figura 34: Gráficos da interação dos parâmetros envolvidos no processo de microencapsulação para análises de rendimento (A e B) e atividade enzimática relativa (C e D).

A análise estatística mostrou que houve interação significativa entre os parâmetros de temperatura e vazão de líquido quando relacionada a atividade enzimática.

4.5.1. Estabilidade das micropartículas após armazenamento a temperatura ambiente ou sob refrigeração

Após a etapa de microencapsulação, o material obtido em cada um dos experimentos foi aliqotado para posterior armazenamento a temperatura ambiente (25°C) e sob refrigeração (4 a 8°C). A estabilidade foi embasada na atividade proteolítica detectada após os períodos de 30, 60 e 90 dias de estocagem.

Na figura 35 é possível observar o perfil de estabilidade do pó armazenado a temperatura ambiente e obtido nos experimentos de microencapsulação.

Figura 35: Perfil de estabilidade de atividade enzimática após 30, 60 e 90 dias de armazenamento a temperatura ambiente (25°C). A atividade enzimática apresentada por cada um dos experimentos no dia 0 (imediatamente após a secagem) foi considerada como 100% de atividade relativa. EB: Extrato bruto não submetido à microencapsulação

O extrato bruto não submetido à microencapsulação apresentou menos de 50% de atividade relativa a partir de 30 dias de armazenamento a temperatura ambiente. Resultados similares também foram observados nos experimentos 9 e 10.

Os experimentos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 11 apresentaram cerca de 75% de atividade relativa mesmo após 90 dias de armazenamento. Neste mesmo tempo de armazenamento, os experimentos 12, 13, 14 e 15 mantiveram níveis de atividade relativa superiores a 75%.

Paralelamente, na figura 36 é possível observar o perfil de estabilidade do pó armazenado sob refrigeração e obtido nos experimentos de microencapsulação.

Figura 36: Perfil de estabilidade de atividade enzimática após 30, 60 e 90 dias de armazenamento sob refrigeração (4-8°C). A atividade enzimática apresentada por cada um dos experimentos no dia 0 (imediatamente após a secagem) foi considerada como 100% de atividade relativa. EB: Extrato bruto não submetido à microencapsulação

O extrato bruto não submetido à microencapsulação perdeu cerca de 50% de atividade a partir de 30 dias de armazenamento sob refrigeração. Considerando as amostras que foram micro encapsuladas, as menores estabilidade foram observadas nos experimentos 9 e 10 que apresentaram atividade relativa de aproximadamente 50% após 90 dias de armazenamento. Os experimentos de 1, 3, 4 e 7 apresentaram cerca de 90% de atividade relativa após 90 dias de armazenamento. Nos

experimentos 2, 5, 6, 8, 11, 12, 13, 14 e 15 não houve perda de atividade enzimática mesmo após 90 dias de armazenamento.

As amostras tiveram perfis de estabilidade similares tanto na temperatura ambiente quanto nas refrigeradas, entretanto em questões absolutas o desempenho das amostras estocadas a 4-8°C foi superior. Vale ressaltar que os bons índices de atividade enzimática das micropartículas estocadas confirmam a eficiência do método de microencapsulação para a estabilidade de produtos.

4.6. Imobilização

O material imobilizado foi o extrato fermentado em bioprocessamento submerso. A imobilização ocorreu a partir dos seguintes suportes: DEAE-Agarose, MANAE-Agarose (adsorção iônica), Bromocianógeno, Amino-glutaraldeído, Glioxil-Agarose e Epoxi (ligação covalente).

Concomitante a imobilização foi realizado um ensaio de estabilizantes, a glicina na concentração de 25% mostrou-se um estabilizante mais eficaz uma vez que manteve 76% da atividade proteolítica após 4 horas em temperatura ambiente e 71% após 6 dias. Os experimentos de imobilização foram realizados com extrato bruto dialisado já adicionados a este estabilizante (Figura 37).

Aminoácidos são estabilizantes de proteínas por mecanismos de ligação direta à macromolécula, capacidade de tamponamento, propriedades antioxidantes e exclusão (CHI, 2012).

Figura 37: Estudo de estabilizantes para o extrato dialisado proveniente do BFSm. *Padrão corresponde ao extrato bruto dialisado inicial (sem adição de estabilizante); **Tempo zero corresponde ao extrato bruto dialisado assim que é adicionado o estabilizante.

A Figura 38 apresenta os resultados obtidos na imobilização em diferentes suportes comparados à atividade inicial do extrato bruto dialisado. As porcentagens imobilizadas em 1 e 2 horas mostram-se acima de 80% na maioria dos suportes, porém a atividade absoluta (calculada em relação a atividade enzimática do extrato bruto dialisado não imobilizado) obtida somente do derivado (enzima já imobilizada no suporte), mostra-se abaixo ou igual a 50% da atividade inicial.

Figura 38: (A) Porcentagem imobilizada da enzima em cada suporte obtida através da proporção de atividade da suspensão pelo sobrenadante, durante tempo determinado; (B) porcentagem absoluta imobilizada de enzima obtida a partir da comparação da atividade do extrato bruto.

O principal objetivo desta imobilização foi procurar uma forma de estabilizar a enzima presente no extrato bruto, para tanto foram feitos ensaios de estabilidade em pH e temperatura dos principais suportes que obtivemos resultados promissores (DEAE, Manae, Glutaraldeído) e também do extrato bruto dialisado.

Figura 39: Estudo de estabilidade da peptidase produzida por *A. terreus* imobilizada em Bromocianogênio, DEAE, Manae, Glutaredaldeído e também do extrato bruto dialisado submetido a imobilização.

A diferença observada entre a caracterização dos suportes pode ser devido ao material imobilizado não ser purificado mas sim um extrato bruto dialisado. Na figura 39 percebe-se que não houve estabilização da enzima tanto na temperatura quanto em pH, como esperado. O máximo suportado pelos derivados em 1 ou 2 horas foi a 40°C. De acordo com Chae e colaboradores (1998) a imobilização de peptidase em suportes como o glutaraldeído, mantiveram a estabilidade em temperatura durante 16 horas a 65°C.

Quanto à exposição ao pH, apesar do pH ótimo destes derivados estarem na faixa de 7-8, a estabilidade manteve-se nos pH's mais ácidos. A presença do estabilizante na imobilização e por consequência no derivado não melhorou o desempenho frente a estabilidade em pH ou temperatura.

5. CONCLUSÕES

O fungo *Aspergillus terreus* é capaz de produzir peptidases em ambos os bioprocessos, sólido ou submerso. A produção enzimática utilizando o bioprocessamento fermentativo sólido obteve melhor performance e o pico de produção nas melhores condições foi cerca de duas vezes maior que o submerso com valores de BFSd 677U/mL (5g de FT, 72 horas, 30°C e 75% de umidade) e BFSm 360U/mL (Meio padrão suplementado com Caseína 0,5%, 72 horas, 35°C). Os níveis de atividade proteolítica apresentados em ambos os bioprocessos, cada um com suas particularidades intrínsecas, podem ser viáveis para aplicação em processos industriais, pois possuem meios de cultura de menor custo facilitando a agregação de valor ao produto gerado.

A caracterização bioquímica parcial dos extratos dos dois bioprocessos mostrou semelhanças entre algumas características das enzimas produzidas como a faixa extensa de pH ótimo abrangendo regiões ácidas, neutra e alcalinas, temperatura ótima pontual de 55°C e perfil de inibição pelo PMSF e EDTA. Contudo, os perfis de estabilidade (pH e temperatura) e comportamento frente a adição de íons apresentaram respostas diferentes entre si, o que sugere a produção de enzimas diferentes produzidas pelo mesmo fungo em meios distintos.

A enzima proveniente do bioprocessamento fermentativo sólido foi purificada utilizando dois processos cromatográficos e a caracterização desta enzima será realizada posteriormente.

Foram utilizados dois processos de estabilização: microencapsulação por *Spray Drying* e imobilização enzimática. Os processos de estabilização estudados demonstraram perfis diferentes. A microencapsulação mostrou-se viável com formulações com rendimentos variando de 37,5-58,2% e com níveis acima de 50% de atividade enzimática. As análises estatísticas demonstraram que a temperatura foi um fator relevante para o maior rendimento e a proporção EE/Ad mostrou-se importante para as melhores atividades enzimáticas. As micropartículas foram eficientes na manutenção da atividade enzimática mesmo após 90 dias de armazenamento. Na estocagem a temperatura ambiente a maior parte das formulações apresentou cerca de 75% de atividade enzimática relativa, enquanto que sob refrigeração as formulações praticamente não perderam atividade

enzimática quando comparadas à atividade detectada imediatamente após a secagem.

A imobilização enzimática demonstrou ser eficaz na etapa de ligação ao suporte, mas não foi capaz de estabilizar a enzima presente no extrato, o que ficou caracterizado pela perda de atividade proteolítica.

6. REFERÊNCIAS

- ABDELMAJEED, N. A.; KHELIL, O. A.; DANIAL, E. N. Immobilization technology for enhancing bio-products industry. **African Journal of Biotechnology**, v.11, p. 13528-13539, 2012.
- ABIDI, F.; LIMAN, F. and NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biode detergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202-1208, 2008.
- AMERI, A.; MAA, Y. F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763 – 768, 2006.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p.175-183, 1997.
- ARROYO, M. Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. **Ars Pharmaceutical**, v 39 n 2 p 23-29, 1998.
- BALAJEE, S. A. *Aspergillus terreus* complex. **Medical Mycology**, v.47, p.542-546, 2009.
- BARRET, A. J.; MCDONALD, J. K. Nomenclature: protease, proteinase and peptidase. **Biochemical Journal**, v.237(3), p.935, 1986.
- BENETT, J.W. An overview of the genus *Aspergillus* in Chapter 1 of *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*, 2010.
- BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRENA, B. M.; BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of enzymes. From: **Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells**, 2° edition, 2006.
- BROGLIA, R. A.; LEVY, Y.; TIANA, G. HIV-1 protease folding and the design of drugs which do not create resistance. **Current Opinion in Structural Biology**, n. 18 p. 60–66, 2008.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. Biocatalysts and enzyme technology, **Wiley – Blackwell**, p. 626, 2012.
- CHAE, H J; IN, M-J; KIM, E Y. Optimization of protease immobilization by covalent binding using glutaraldehyde. **Applied biochemistry and biotechnology**, v 73, 1998.

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, pp. 239–244, 2000.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, 501-505, 1947.

CHELLAPANDI, P. Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. **E-journal of chemistry**, v 7 n 2 p 479-482, 2009.

CHI, E. Y. Excipients and their Effects on the Quality of Biologics. Meeting - Excipients and the Effect on Biologics Quality: How Variability in Excipients Impacts Biological Formulations, **Organized by the FDD Section Excipients Focus Group**, 2012.

Diagnóstico de Referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil. Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior, Secretaria de inovação e Fundação Bio, 2012. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/noticia.php?area=3¬icia=11892>>

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures – Process Characteristics, Products, and Applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, Capítulo 9, p. 225-271, 2007.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; RODRIGUEZ, V.; SANTANA, C.; SOLER, G.; BASTIDA, A.; GUISAN, J. M. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling methods. **Enzyme Microbiology Technology**, v.15, 1993.

FILHO, S.C.V.; SILVA, F.F.; JÚNIOR, V.R.R.; CAPELLE, E.R. Tabelas de composição de alimentos e exigências nutricionais para bovinos no Brasil. **II Simpósio de Produção de Gado de Corte**, 2011.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 234-237, 2006.

FREEDONIA GROUP. **World Enzymes to 2015**. Cleveland, 2011. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/DocumentDetails.aspx?ReferrerId=FG-01&studyid=2824>>. Acesso em 20/01/2012.

GARCIA-CARREÑO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of protease without tears. **biochemical education**, v.25, n.3, P.161-167, 1997.

GAO, J.; WENG, H.; ZHU, D.; YUAN, M.; GUAN, F.; XI, Y. Production and characterization of cellulytic enzymes from the thermoacidophilic fungal *Aspergillus*

terreus M11 under solid-state cultivation of corn stover. **Bioresource Technology**, v 99, p 7623-7629, 2008.

GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology** 144, 1–22, 2008.

GUISAN, J. M. Aldehyde-agarose gels as activated supports for immobilization-stabilization of enzymes. **Enzyme Microbiology Technology**, v.10, 1987.

GULATI, R.; SAXENA, R.K.; GUPTA, R. Fermentation and downstream processing of lipase from *Aspergillus terreus*. **Process Biochemistry** v. 36, p. 149–155, 2000.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

HAIJJI, M.; REBAI, A.; GHARSALLAH, M.; NASRI, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79 p. 915-923, 2008.

HAMILTON, J. R. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. **Blood reviews**, n. 23, p. 61-65, 2009.

JIAN, S.; WENYI, T.; WUYONG, C. kinetics of enzymatic unhairing by protease in leather industry. **Journal of Cleaner Production**. v.19, p.325-331, 2011.

KATCHALSKI-KATZIR, E. Immobilized enzymes – learning from past successes and failures. **Tibtech November**, v.11, 1993.

KHAN, A. A.; ALZOHAIRY, M. A. Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: A review. **Research Journal of Biological Sciences**, v.5, p.565-575, 2010.

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization – Review. **Analytical Biochemistry**, v.93, p.1-25, 1979.

KRISHNA, C. Solid state fermentation systems – An overview. **Critical reviews in biotechnology**, v 25 p 1-30, 2005.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

KUMAR, S.; SHARME, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, L. L. M. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental **Química Nova**, vol. 33 no. 2.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOHS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, n. 22, p. 85-94, 2000.

LÓPEZ, R. E. S. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, vol. 33 n. 7.

LÓPEZ-GALLEGO, F. Desarrollo de nuevos catalizadores enzimáticos para la producción directa de cefalosporinas semissintéticas a partir de cefalosporina C. **Tese (Doutorado) – Universidad Autonoma de Madrid, Facultad de Ciencias Departamento de Biología Molecular**, Madrid – Espanha, 2006.

LOTONG, N; SUWANARIT, P. Production of soy sauce koji mold spores inoculum in plastic bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v 46 n 5 p 1224-1226, 1985.

LUZ, F. F. Desenvolvimento de um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção. **Tese de Mestrado, UFRS – Centro de Biotecnologia**, 2007.

MACCHIONE, M.M.; MERHEB, C.W.; GOMES, E.; SILVA, R. Protease Production by Different Thermophilic Fungi. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.146, p.223–230, 2008.

MADRUGA, S.; CAMARA, S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Biochemistry**, v. 68 p. 41-44, 2000.

MALAJOVICH, M. A. Biotecnologia 2011. **Biotecnologia: Ensino e Divulgação**, Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de tecnologia ORT, 2012.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M. FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques, 2007.

MERHEB-DINI, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v. 104 p. 127-131, 2007.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, C.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLI, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the

Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 n. 19 p. 9210 – 9217, 2009.

NAMALDI, A.; ÇALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of Spray Drying Temperature and Additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, v. 24, n. 11, p. 1495 – 1500, 2006.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de peptidases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

NATH,S.; SATPATHY, G. R. A systematic approach for investigation of spray drying processes. **Drying technology: An international Journal**, v.16, p.1173-1193, 1998.
NOVOZYMES (2008) Enzymes at work. Disponível em: <www.novozymes.com>

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I. and del RÍO, L. A. Plant peptidases protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.

PALOMO, J. M. Control y modulación de la selectividad de diferentes derivados de lipasas en reacciones de química orgánica en medios macro-acuosos, **Tese (Doutorado) – Universidad Autonoma de Madrid, Facultad de Ciencias Departamento de química Orgánica**, Madrid – Espanha, 2003

PANDEY,A. Recent process developments in solid-state fermentation, **Process Biochemistry**, v.27,p.109–117, 1992.

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

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

PARRA, A. Q.; CHUKHRAI, E. S. Análisis cinético del proceso de termo inactivación de la aminoacilasa I. **Revista de la facultad de Ciencias Basicas**, v.8, n.2, 2010.

PEREIRA, N. J.; BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A. Tecnologia de bioprocessos. **Séries em biotecnologia**. v.1, 2008.

PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V., GUIÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic B-galactosidase via ionic adsorption on PEI- coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 369-374, 2003.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **American Society for Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 597 – 635, 1998.

RAO, S. C.; SATHISH, T.; RAVICHANDRA, P.; PRAKASHAM, R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 262-268, 2009.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Review- Microencapsulation of microbial cells. **Journal of food engineering**, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286 p. 38321-38328, 2011.

Relatório de Biotecnologia, Comitê nacional de Biotecnologia - Ministério do desenvolvimento, indústria e comércio exterior , 2010. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=3&menu=2249>>

ROSA, E. D; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/secagem%20de%20materiais.pdf>>. Acesso em 20/06/2012.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process**

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195 – 1236, 1998.

Research & Development, v. 15, p. 224-230, 2011. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55 n. 1 p. 13-18, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v.40 p. 2689-2694, 2005.

SANTOS, J. A. N. Inibição e especificidade da Lbpro do vírus da febre aftosa. 2009. 93p. **Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo, 2009.

SARATH G., DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996.

SAVITHA, S.; SADHASIVAN, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. **Protein structure a practical approach**. New York: Oxford University, p. 1-19, 1989.

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275-2279, 2002.

SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 311-318, 2004.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, 2009.

STEFANOVA, M E; BELETSKAYA, O P; KULAEV, I S. Characterization of two extracellular proteinases from *Aspergillus terreus* and their role in the formation of low molecular weight endoglucanases. **Process biochemistry**, v 32 n 8 p 685-689, 1997.

SUKHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B.; VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447-451, 2003.

SUBRAMANIAM, 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, p. 480-486, 2012.

SYMOENS, F.; BOUCHARA, J.P.; HEINEMANN, S.; NOLARD, N. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. **Hospital Infection** v. 44: 273–280, 2000.

TIPTON, K F; MCDONALD, A G; DIXON, H B F. Effects of pH on enzymes. BOOK: Contemporary enzyme kinetics and mechanism, 3^o edition, 2009.

TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of Food Science**, v. 67 n. 3, p. 1184-1187, 2002.

TSURUOKA, N.; NAKAYAMA, T.; ASHIDA, M.; HEMMI, H.; NAKAO, M.; MINAKATA, H.; OYAMA, H.; ODA, K.; NISHINO, T.; Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning and heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 162-169, 2003

YOUNG-CHUL, S.; SUNG-GU, L.; DONG-CHEOL, L.; BYUNG-YOUNG, K.; KYUNG-MOK, P.; JANG-YOUNG, L.; MOO-SUNG, K.; IH-SEOP, C. and JOON-SHICK, R. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**, n. 22, p. 137-140, 2000.

WILSON, T. J. & SINGH, R. K. Proteases as modulators of tumor-stromal interactions: primary tumors to bone metastases. **Biochimica et Biophysica**, v.1785, p.85-95, 2008.

LOMBADA

SIQUEIRA, A.C.R.	Bioprocessos fermentativos, purificação, caracterização e estabilização de peptidase secretada pelo fungo <i>Aspergillus terreus</i>	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da
---------------------	---	---