UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de proteases por fungos filamentosos isolados
do cerrado do centro-oeste brasileiro**

Paula Monteiro de Souza

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães

São Paulo

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

**Produção de proteases por fungos filamentosos isolados
do cerrado do centro-oeste brasileiro**

Paula Monteiro de Souza

Tese para obtenção do grau de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Souza, Paula Monteiro de
S729pr Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do
cerrado do centro-oeste brasileiro / Paula Monteiro de Souza. --
São Paulo, 2015.
125p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-
Farmacêutica.
Orientador: Pessoa Junior, Adalberto
Co-orientador: Magalhães, Pérola de Oliveira

1. Fungo : Biotecnologia 2. Tecnologia farmacêutica 3.
Produtos biotecnológicos : Purificação 4. Proteases microbianas
I. T. II. Pessoa Junior, Adalberto, orientador. III. Magalhães,
Pérola de Oliveira, co-orientador.

620.8 CDD

Paula Monteiro de Souza

Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste
brasileiro

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

4º Examinador

5º Examinador

São Paulo, 26 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTO

À minha família, minha mãe, meu pai e meus irmãos pelo incentivo, pelas preocupações e pelo total apoio durante esses anos do doutorado. Ao Felipe pelo amor, companhia, incentivo e compreensão.

Ao professor Adalberto Pessoa Junior pela orientação, apoio, confiança, incentivo e disponibilidade sempre apresentada ao longo de todos os anos de trabalho.

À professora Pérola pela orientação, confiança, amizade e por todos os momentos de aprendizado que passamos juntos.

Alla professoressa Patrizia per l'orientamento, l'incoraggiamento, comprensione e l'assistenza durante il soggiorno a Genova.

Ao professor Attilio pela orientação, confiança, ensinamentos e apoio durante o período que permanecia em Gênova, bem como após a volta para o Brasil.

Ao professor Edivaldo Ximenes pelo apoio, por disponibilizar as espécies de fungos filamentosos, e por disponibilizar espaço e estrutura do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB).

Aos colegas da UnB, Renata, Raquel, Carol, Marcela, Luana, Gabi, Márcia, Mona, Diegue, Patrícia e Michelle pela colaboração, apoio e amizade.

All'amici del l'Università di Genova, Bahar, Alberto, Marco, Matia, Davide e Marcos per il supporto e l'amicizia.

Aos colegas da USP, Bruna, Rafaela, Angela, Valker, Alex e Thalita pelo apoio e amizade.

À FAPESP pelo apoio financeiro e pela bolsa de doutorado, e à CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	6
RESUMO.....	8
ABSTRACT	9
OBJETIVOS	13
CAPÍTULO I	14
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Classificação das Proteases.....	14
1.2 Aplicações Industriais	18
1.3 Produção de Proteases por Fungos	22
1.4. Processos Fermentativos	25
1.5. Biorreatores	25
1.6 Coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La).....	27
1.7 Cerrado.....	28
CAPÍTULO II	30
1. INTRODUÇÃO	30
1.1 Proteases.....	30
1.2 Cerrado.....	32
2. MATERIAIS E MÉTODO.....	33
2.1. Isolamento dos fungos filamentosos.....	33
2.2. Condições de cultivo.....	35
2.3. Triagem para atividade de proteases.....	35
2.4. Determinação da atividade proteolítica.....	36
2.5. Produtividade.....	36
3. RESULTADOS.....	37
3.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de proteases	37
3.2. Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio para produção de protease ...	39
4. CONCLUSÃO	43
CAPÍTULO III	44
RESUMO	44

1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS	46
2.1. Materiais	46
2.2. Micro-organismo	46
2.3. Produção de proteases	46
2.4. Determinação da atividade de proteases	47
2.5. Efeito da velocidade de agitação, temperatura e pH do meio na produção de proteases	48
2.6. Seleção da melhor fonte de carbono e nitrogênio	48
2.7. Composição química dos meios de cultivo	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
3.1. Crescimento e produção de protease pelo fungo <i>A. foetidus</i>	50
3.2. Efeitos da temperatura, velocidade de agitação e pH do meio na produção de proteases	52
3.4. Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease	57
3.5. Efeito da concentração de peptona na produção de protease	59
3.6. Cinética de crescimento e produção de protease	60
4. CONCLUSÃO	62
CAPÍTULO VI	63
RESUMO	63
1. INTRODUÇÃO	64
2. MATERIAIS E MÉTODOS	65
2.1. Micro-organismo	65
2.2. Produção de protease ácida por cultivo submerso em biorreator	66
2.3. Determinação da atividade de protease	66
2.4. Produtividade	67
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
3.1. Determinação do Valor do $k_L a$	72
4. CONCLUSÃO	73
CAPÍTULO IV	74
RESUMO	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAIS E MÉTODOS	76
2.1. Micro-organismo e condições de cultivo	76

2.2 Determinação da atividade de protease	77
2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos	77
2.4 Estudo termodinâmico	78
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4. CONCLUSÃO	87
CAPÍTULO V	88
RESUMO	88
1. INTRODUÇÃO	88
2. MATERIAIS E MÉTODOS	90
2.1. Materiais	90
2.2. Micro-organismo e condições de cultivo	90
2.3. Determinação da atividade de protease	91
2.4. Efeito do pH na atividade de protease	92
2.5. Purificação da proteína	92
2.6. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)	92
2.7. Zimograma.....	93
2.8. Efeito de inibidores de protease e de íons metálicos na atividade enzimática	93
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.1. Purificação e parcial caracterização da protease aspártica	94
3.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da protease ácida	96
3.3. Efeito de inibidores de protease, íons metálicos e detergentes na atividade da protease ácida.	98
4. CONCLUSÃO	100
CONSIDERAÇÕES FINAIS	101
PERSPECTIVAS FUTUTRAS.....	103
ANEXOS	119

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da hidrólise de uma ligação peptídica.....14
- Figura 2. Imagem de uma planta pertencente a vegetação do cerrado.28
- Figura 3. Espécies de fungos filamentosos que apresentaram formação de halo em Ágar-leite. (1) *Aspergillus foetidus*; (2) *Aspergillus versicolor*; (3) *Fusarium solani*; (4) *Paecilomyces variotti*; (5) *Penicillium citrinum*; (6) *Penicillium crustosum*; (7) *Penicillium decumbens*; (8) *Penicillium fellutanum*; (9) *Penicillium restrictum*.38
- Figura 4. Atividade proteolítica das 9 espécies de fungos filamentosos, utilizando como substrato azocaseína em pH 5. Condições de cultivo: Meio 1 contendo caldo Sabourad 3% (p/v) e leite desnatado 2% (p/v) e Meio 2 contendo caldo Sabouraud 3% (p/v), peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v) e extrato de levedura 1% (p/v), a 28 °C e 150 rpm. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.....42
- Figura 5. (A) Concentração de biomassa (■), concentração de glicose (○), (B) pH do meio e (C) atividade de protease durante o cultivo submerso de *A. foetidus* a 28 °C e 150 rpm em meio PYCS com pH inicial de 6,1.51
- Figura 6. Efeito da temperatura e da velocidade de agitação na atividade de protease extracelular do fungo *A. foetidus*. Valores são as médias de triplicatas $\pm$ desvio padrão. Condições de cultivo: meio PYCS com pH inicial de 7.0. *As diferenças significativas relacionadas com a velocidade de agitação (* $p<0,05$) foram encontrados por *one way* ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.53
- Figura 7. Gráfico de superfície de resposta para a atividade de protease (U/mL) em função da temperatura (X_1) (°C) e pH inicial do meio (X_2).56
- Figura 8. Produção de protease pelo fungo *A. foetidus* (barras) e pH final do meio (■) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio: peptona e caldo Sabouraud (PS); peptona, extrato de levedura e caldo Sabouraud (PYS); peptona, extrato de levedura, caseína e caldo Sabouraud (PYCS); peptona, caseína e caldo Sabouraud (PCS); caseína e caldo Sabouraud (CS); peptona e extrato de levedura (PY); peptona (P); e caseína (C). Condições de cultivo: 28 °C, 150

rpm, 168 h. As diferenças significativas (* $p < 0,05$) foram encontrados por <i>one way</i> ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.....	57
Figura 9. Efeito da concentração de peptone no crescimento (■), pH final do meio (▲) e atividade de protease (♦) do fungo <i>A. foetidus</i> . Condições de cultivo: 28 °C, 150 rpm, 168 h. As diferenças significativas (* $p < 0,05$) foram encontrados por <i>one way</i> ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.	60
Figura 10. Produção de protease pelo fungo <i>A. foetidus</i> em meio contendo peptona, linha (—); e meio PYCS (peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e caldo Sabouraud 3% (p/v), linha (·····),.....	61
Figure 11. Produção de proteases pelo fungo <i>A. foetidus</i> por cultivo submerso em biorreator variando a aeração do meio em função do tempo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	68
Figura 12. Produção de proteases pelo fungo <i>A. foetidus</i> por cultivo submerso em biorreator variando a velocidade de agitação do meio em função do tempo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	69
Figura 13. Valores do pH do meio ao longo do tempo no cultivo submerso do fungo <i>A. foetidus</i> em biorreator variando a aeração do meio. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	70
Figura 14. Valores do pH do meio ao longo do tempo no cultivo submerso do fungo <i>A. foetidus</i> em biorreator variando a velocidade de agitação do meio. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.	70
Figura 15. Efeito do pH na atividade da protease ácida extracelular produzida pelo fungo <i>A. foetidus</i> . As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.....	80
Figura 16. Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise da azocaseína pela protease ácido do fungo <i>A. foetidus</i> versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.....	81

Figura 17. Efeito da temperatura na atividade da protease ácida extracelular produzida pelo fungo <i>A. foetidus</i>	82
Figura 18. Gráfico de Arrhenius da atividade inicial da protease ácida produzida pelo fungo <i>A. foetidus</i> utilizando azocaseína como substrato.	82
Figura 19. Semi-log da desnaturação irreversível da protease ácida produzida pelo fungo <i>A. foetidus</i> . T (°C): 55 (●); 60 (■); 65 (▲); 67 (x); 70 (◆). pH ₀ 5.0; atividade inicial de protease = 50 U/mL; concentração inicial de substrato = 1 mM azocasein.....	84
Figura 20. Perfil da cromatografia em coluna de permeação em gel Sephacryl S-200 para (●) atividade de protease ácida e (■) proteína presente no extrato bruto do fungo <i>A. foetidus</i>	95
Figura 21. (A) Análise de SDS-PAGE da purificação da protease ácida. Coluna 1 - marcadores de peso molecular baixo (14.4- 97.4 kDa, GE-Lifesciences), coluna 2 - protease ácida purificado por cromatografia de coluna Sephacryl S-200. (B) Zimograma da protease ácida. A região clara (indicado pela seta) mostra a hidrólise de caseína por esta enzima.....	96
Figura 22. Efeito do pH na atividade da protease ácida purificada.	97
Figura 23. Efeito da temperatura na atividade da protease ácida purificada.....	98
Figura 24. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(CS - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração.....	120
Figura 25. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(CS - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.....	121
Figura 26. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(CS - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração.....	122
Figura 27. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(CS - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.....	123
Figura 28. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(CS - C)$, em função do tempo para a condição de 300 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com reação catalisada e sítio ativo.	15
Tabela 2. Características gerais de quatro tipos de proteases.....	16
Tabela 3. Classificação das proteases de acordo com a base de dados MEROPS. 17	
Tabela 4. Fungos filamentosos isolados do Cerrado Brasileiro.....	34
Tabela 5. Produtividade obtida pelos 9 fungos filamentosos após 168 h de cultivo..	42
Tabela 6. Níveis das variáveis independentes para estudar a influência de pH, temperatura e relação C/N na produção de protease pelo fungo <i>A. foetidus</i> . ..	54
Tabela 7. Resultados experimentais da atividade de protease obtidas a partir do planejamento fatorial 2 ³ . Variáveis independentes: pH, temperatura e relação C/N.....	54
Tabela 8. Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização da produção de protease.	55
Tabela 9. Composição elementar dos components do meio utilizados para a produção de protease pelo fungo. ^a	59
Tabela 10. Principais parâmetros cinéticos e rendimento da produção de protease pelo fungo <i>A. foetidus</i>	61
Tabela 11. Produtividade obtida pelo cultivo submerso do fungo <i>A. foetidus</i> em biorreator para a produção de proteases.	71
Tabela 12. Valores de kLa em função das condições de agitação e aeração obtidas em água no fermentador New Brunswick.	73
Tabela 13. Parâmetros termodinâmicos e cinéticos da desativação (desnaturação) térmica irreversível da protease ácida produzida pelo fungo <i>A. foetidus</i>	85
Tabela 14. Purificação da protease ácida do fungo <i>A. foetidus</i>	95
Tabela 15. Efeito de inibidores de protease e íons metálicos na atividade da protease purificada.	99
Tabela 16. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração.	119
Tabela 17. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.	120

Tabela 18. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração.	121
Tabela 19. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 100 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.	122
Tabela 20. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 300 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔG_d^*	Energia livre de Gibbs
ΔH_d^*	Entalpia de desativação
ΔH_U°	Variação de entalpia padrão
ΔS_d^*	Entropia de desativação
$\mu_{\max}$	Velocidade máxima de crescimento
ANOVA	Análise de variância
E^*	Energia de ativação
E_d^*	Energia de ativação da desnaturação irreversível da enzima
GRAS	Generally Recognized as Safe
PDA	Potato Dextrose Agar
PYCS	Caldo Sabouraud, Peptona, Caseína e Extrato de levedura
DNS	Ácido dinitrosalícílico
PS	Caldo Sabouraud e Peptona
PYS	Caldo Sabouraud, Peptona e Extrato de levedura
PCS	Caldo Sabouraud, Peptona e Caseína
CS	Caldo Sabouraud e Caseína
PY	Peptona e Extrato de levedura
k_d	Constante de desativação de primeira ordem
K_m	Constante de Michaelis-Menten
P	Peptona
C	Caseína
SD	Desvio padrão (<i>Standard deviation</i>)
C/N	Relação carbono e nitrogênio
$Y_{E/X}$	Fator de conversão de célula em quantidade de enzima
PMSF	Fenilmetanosulfonilfluoreto
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
UV	Ultra-violeta
SDS–PAGE	Dodecil-sulfato de sódio de poliácridamida
kLa	Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio
<i>p</i> -CMB	<i>p</i> -Cloromercurilbenzoato

Pro	Prolina
Gln	Glutamina
STR	Biorreator de agitação mecânica (<i>Stirred Tank Reactor</i>)
DRCB	Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol
DG 18	Dicloran Glicerol 18%
BDA	Ágar batata dextrose
TCA	Ácido tricloroacético
pH ₀	pH inicial do meio
P	Produtividade
$P_{E,max}$	Produtividade máxima da enzima
$P_{X,max}$	Produtividade máxima de biomassa
S_0	Concentração inicial de substrato
T	Temperatura
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
v_{max}	Velocidade máxima
vvm	Volume de ar por volume de meio por minuto
$Y_{E,max}$	Produtividade específica máxima da enzima

RESUMO

Souza, P.M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Proteases ácidas pertencem a um importante grupo de enzimas industriais produzidas por fungos filamentosos, com aplicações na indústria de alimentos, de couro, farmacêutica e de cosméticos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a produção de proteases ácidas extracelulares de fungos filamentosos isolados do solo do cerrado do centro-oeste brasileiro. Inicialmente, foi realizada uma triagem para avaliar a capacidade de 17 linhagens de fungos quanto à produção de protease em meio de cultura contendo Agar-leite. O fungo *Aspergillus foetidus* foi selecionado como melhor produtor de protease ácida extracelular. Visando à otimização da produção de proteases pelo fungo selecionado, avaliou-se a influência de diversos fatores no cultivo (pH, temperatura, agitação e diferentes fontes de nitrogênio e carbono). Após essa etapa, um planejamento experimental estatístico foi realizado com as variáveis independentes temperatura, pH inicial do meio e fonte de carbono e nitrogênio. A produção máxima de protease foi encontrada (63,7 U/mL) nas condições: pH inicial do meio igual a 7,0 a 28 °C, 150 rpm em peptona 2% (p/v). Os estudos em biorreator demonstraram produção de protease nas condições de agitação e aeração iguais à 300 rpm e 1,0 vvm, após 120 h de cultivo. Os ensaios com diferentes temperaturas para a estimativa dos parâmetros termodinâmicos demonstraram que a protease ácida produzida pelo fungo é altamente estável apresentando máxima atividade em pH 5,0 e temperatura ótima igual a 55°C. E, finalmente, para a purificação da enzima foi realizada cromatografia de gel-filtração. A enzima apresentou massa molecular de 50,6 kDa, e a análise do zimograma confirmou a atividade proteolítica. Além disso, a protease purificada foi inibida pelo composto pepstatina, indicando uma característica de protease ácida. Esses resultados obtidos demonstram um fungo filamentoso produtor de uma nova protease ácida com potencial aplicação para indústria farmacêutica e de cosméticos.

Palavras-chave: protease ácida; fungos filamentosos; *Aspergillus foetidus*; termodinâmica; purificação; cultivo submerso; otimização

ABSTRACT

Souza, P.M. **Protease production by filamentous fungi isolated from the midwestern Brazilian Cerrado**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The acid proteases belong to the most important group of industrial enzymes produced by filamentous fungi, with applications in the food, leather, pharmaceutical and cosmetics industries. This study aimed the evaluation of extracellular acid proteases production from filamentous fungi isolated from different samples of the midwestern Brazil cerrado. Initially, a screening was performed to assess the ability of the 17 strains of yeast for production of protease-agar medium containing milk culture. The *Aspergillus foetidus* was selected as the best producer. Aimed at optimizing the production of proteases by the selected fungus, first evaluated the influence of various factors on the cultivation (pH, temperatura, agitation and different sources of nitrogen and carbon). After this step, a statistical experimental design was carried out with the independent variables temperatura, initial pH of the medium and source of carbon and nitrogen. The best conditions for protease production were (63.7 U / mL): initial pH values greater than 7.0, at 28 °C, 150 rpm peptone 2% (w/v). Aiming future production of this protease in industrial scale, studies have shown better in bioreactor protease production under the conditions of agitation and aeration equal to 300 rpm and 1.0 vvm, after 120 h of cultivate. The tests at different temperaturas to estimate the thermodynamic parameters showed that the acid protease produced by the fungus is highly stable with maximum activity at pH 5.0 and optimum temperatura of 55 °C. And finally, for the purification of the enzyme were performed gel-filtration chromatography. The enzyme had a molecular mass of 50.6 kDa, and the analysis of the zymogram showed a proteolytic band. Furthermore, the purified protease was inhibited by pepstatin compound, indicating a feature of acid protease. These results demonstrate a new filamentous fungus producing acid protease with potential application to pharmaceuticals and cosmetics.

Keywords: acid protease; filamentous fungi; *Aspergillus foetidus*; thermodynamics; purification; submerged cultivation; optimization.

RIASSUNTO

Souza, P.M. **Produzione di proteasi da funghi filamentosi isolati dal midwest brasiliano Cerrado**. 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Le proteasi acide appartengono al gruppo più importante di enzimi industriali prodotte da funghi filamentosi, con applicazioni nell'industria alimentare, cuoio, farmaceutico e cosmetico. Questo studio si propone la valutazione di acido extracellulare proteasi produzione da funghi filamentosi isolati da campioni diversi del Midwest cerrado Brasile. Inizialmente, è stato eseguito uno screening per valutare la capacità dei 17 ceppi di lievito per la produzione di proteasi-agar contenente coltura di latte. Il fungo *Aspergillus foetidus* è stato selezionato come il miglior produttore. Volti ad ottimizzare la produzione di proteasi dal fungo selezionato, prima valutata l'influenza di vari fattori sulla coltivazione (pH, temperatura, agitazione e diverse fonti di azoto e carbonio). Dopo questo passo, un disegno sperimentale statistica è stata effettuata con temperatura variabili indipendenti, pH iniziale della fonte di carbonio e azoto medio. Le migliori condizioni per la produzione di proteasi erano (63,7 U/mL): pH iniziale valori superiori a 7,0, a 28 °C, 150 rpm peptone 2% (w/v). Mirare produzione futura di questa proteasi in scala industriale, studi hanno dimostrato una migliore produzione bioreattore proteasi nelle condizioni di agitazione e aerazione pari a 300 rpm e 1,0 vvm, dopo 120 h di cultivate. Le prove a diverse temperatura per stimare i parametri termodinamici mostrato che la proteasi acido prodotto dal fungo è altamente stabile con la massima attività a pH 5,0 e la temperatura ottimale di 55 ° C. E gel-filtrazione, infine, per la purificazione dell'enzima sono state eseguite cromatografia e scambio ionico. L'enzima ha una massa molecolare di 50,6 kDa, e l'analisi della zymogram mostrava una banda proteolitica. Inoltre, la proteasi purificata è stata inibita da Pepstatin composto, che indica una caratteristica di proteasi acida. Questi risultati dimostrano un nuovo fungo produce filamentose proteasi acido con potenziali applicazioni per prodotti farmaceutici e cosmetici.

Parole-chiave: proteasi acida; funghi filamentosi ; *Aspergillus foetidus*; termodinamica; depurazione; coltivazione sommersa; ottimizzazione.

INTRODUÇÃO

Enzimas são amplamente utilizadas nos processos biotecnológicos e industriais e apresentam uma grande participação no mercado mundial. A maioria das enzimas empregadas nesses processos pertence ao grupo das hidrolases, dentre as quais se destacam as proteases. Estima-se que em 2013 o mercado de enzimas era de 4,4 bilhões de dólares, e acredita-se que ocorrerá um aumento para 7,6 bilhões em 2020 (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). Dentre as enzimas industriais 75% são enzimas hidrolíticas, das quais dois terços são proteases (FELIX, NORONHA e DE MARCO, 2004; SAVITHA *et al.*, 2011). As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, movimentando cerca de 1,2 bilhões de dólares, uma vez que desempenham importante papel na área da biotecnologia (GRAND VIEW RESEARCH, 2014). A relevância desse grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismos de ação reflete-se na importância de suas aplicações nos processos industriais, como nas indústrias de alimentos, têxtil, farmacêutica, de couro e de detergentes (ZANPHORLIN *et al.*, 2011).

As proteases são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos e são amplamente distribuídas na natureza, podendo ser encontrada em plantas, animais e micro-organismos. O processo de produção de proteases a partir de plantas é muito demorado e depende de alguns fatores, como a disponibilidade de terras para o cultivo e as condições climáticas para o crescimento. A produção de proteases de origem animal depende da disponibilidade de animais para o abate, o que envolve políticas públicas e agrícolas. Assim, como a produção de proteases de plantas e animais não atende a demanda mundial de enzimas, existe um grande interesse na produção de proteases a partir de micro-organismos (RAO *et al.*, 1998; FELIX, NORONHA e DE MARCO, 2004; KUMAR *et al.*, 2005).

Os micro-organismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua ampla diversidade bioquímica e à sua susceptibilidade à manipulação genética, além de poderem ser facilmente cultivados em larga escala e proporcionarem altos rendimentos (KUMAR *et al.*, 2005). Por isso, a produção de enzimas de origem microbiana é um processo mais rápido, mais fácil e com menor custo. Além disso, proteases microbianas atuam sobre substratos específicos, podendo ser usadas em

diversas áreas da bioquímica e biotecnologia (BARATA *et al.*, 2002). Proteases de origem microbiana representam aproximadamente 40% da venda total mundial de enzimas. Tal importância econômica justifica o interesse gerado pela busca por micro-organismos capazes de influenciar favoravelmente os processos e a produção de proteases com novas propriedades de interesse industrial e econômico (RAO *et al.*, 1998; POZA *et al.*, 2001).

Além disso, as proteases ácidas de importância comercial são geralmente produzidas por fungos filamentosos e são enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos e farmacêutica (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000). Recentemente, as proteases ácidas com pH ótimo foram identificadas na pele associada à descamação e, por conseguinte, alguns delas com capacidade para induzir esfoliação estão entre os potenciais compostos ativos em produtos cosméticos (BERNARD *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2007). As proteases ácidas de origem fúngica, possuindo propriedades similares à pepsina ou à renina, e constituem um grupo que apresenta atividade a valores baixos de pH (entre 2 e 5). Hidrolisam uma ampla faixa de ligações peptídicas, exibindo geralmente atividade endo e exo proteolíticas. São sensíveis a sulfidrilas, agentes quelantes e metais pesados. A estabilidade de atuação está situada, na maior parte dos casos pesquisados, na faixa de pH entre 2 e 6, sendo rapidamente inativadas a pH de valores maiores, assim como a temperaturas superiores a 50°C. Várias proteases ácidas apresentam, como característica comum, a pequena quantidade de aminoácidos básicos e baixos pontos isoelétricos. E os principais micro-organismos utilizados são do gênero *Aspergillus*.

Nesse contexto, o conhecimento da produção e caracterização de proteases ácidas produzidas por espécies de fungos filamentosos isolados da região do cerrado do centro-oeste brasileiro contribuirá na aplicação dessas proteases em processos biotecnológicos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos filamentosos isolados de diferentes amostras do cerrado do centro-oeste brasileiro, frente à produção de proteases ácidas extracelulares de interesse industrial e/ou farmacêutico em diferentes condições de cultivo.

Objetivos específicos

- Identificar a capacidade destes fungos quanto à produção de protease em placa de Petri;
- Avaliar a influência de diferentes fatores físico-químicos durante o cultivo na produção de proteases pelos fungos, como fontes e concentrações de nitrogênio e carbono, pH e temperatura utilizando planejamento experimental estatístico;
- Realizar o estudo termodinâmico e de estabilidade das proteases extracelulares presentes no extrato bruto;
- Estudar a influência de diferentes condições de agitação e aeração, expressa pelo coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), na produção da enzima em biorreator.
- Caracterizar a enzima quanto às suas constantes cinéticas, temperatura ótima, pH ótimo, inibição por metais e atividade frente a inibidores específicos de proteases.

CAPÍTULO I

Este capítulo apresenta uma revisão geral e atualizada da literatura, a qual serviu de subsídio para análise e posterior discussão dos resultados apresentados nos demais capítulos. Nele é possível encontrar tópicos que descrevem a classificação das proteases, a aplicação biotecnológica dessas enzimas em diferentes áreas da indústria, a produção de proteases por fungos filamentosos e a definição de processos fermentativos em biorreatores.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Classificação das Proteases

Proteases (peptidases ou peptídeo hidrolases) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em molécula de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (Figura 1) (RAO *et al.*, 1998). Constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008).

Figura 1. Ilustração da hidrólise de uma ligação peptídica.

As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, enquanto as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, removendo um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo de uma ou outra região terminal. Além disso, as exopeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos do sítio ativo envolvidos no mecanismo catalítico (Tabela 1).

As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas próximas aos terminais carboxílicos (carboxipeptidases) e amina (aminopeptidases) do substrato. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serinoproteases (EC 3.4.16), metaloproteases (EC 3.4.17), cisteínoproteases (3.4.18), peptidil dipeptidases (EC 3.4.15) e dipeptidase (EC 3.4.13). Já as aminopeptidases compreendem as dipeptidil peptidases e as tripeptidil peptidases (3.4.14). Existem ainda exopeptidases que removem resíduos de aminoácidos substituídos, denominadas omega peptidases (EC 3.4.19). (RAO *et al.*, 1998; SINGH, BATRA e SOBTI, 2001; GUPTA, BEG e LORENZ, 2002; VERMELHO *et al.*, 2008).

Tabela 1. Classificação das proteases de acordo com reação catalisada e sítio ativo.

Proteases			Número EC
Exopeptidases	Aminopeptidases	Aminopeptidases	3.4.11
		Dipeptidil peptidases	3.4.14
		Tripeptidil peptidases	3.4.14
	Carboxipeptidases	Serina	3.4.16
		Metalo	3.4.17
		Cisteína	3.4.18
		Peptidil dipeptidase	3.4.15
		Dipeptidase	3.4.13
	Omegapeptidases		3.4.19
	Endopeptidases	Serina	3.4.21
Cisteína		3.4.22	
Aspartico		3.4.23	
Metalo		3.4.24	

* Nomenclature Committee of the international Union of Biochemistry and Molecular Biology, "Enzyme nomenclature 1992", Academic Press, Orlando, Florida, 1992.

As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteinases (EC 3.4.23) e metaloproteinases (EC 3.4.24). As serina-peptidases possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto as aspártico-proteinases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. As cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteinases necessitam de íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO *et al.*, 1998; VERMELHO *et al.*, 2008). As características gerais dessas quatro classes de endoproteases estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Características gerais de quatro tipos de proteases.

Características				
Tipo de protease	Aspártico	Cisteína	Metalo	Serina
EC N°	3.4.23	3.4.22	3.4.24	3.4.21
Peso Molecular (kDa)	30-45	34-35	19-37	18-35
pH ótimo	3-5	2-7	5-7	6-11
Temperatura ótima (°C)	40-55	40-45	65-85	50-70
Resíduo do sítio ativo	Ácido aspártico	Aspartato ou cisteína	Fenilalanina ou leucina	Serina, histidina e aspartato
Principais inibidores	Pepstatina	Iodoacetamida, p-CMB	Agentes quelantes, como EDTA	Fenilmetilsulfonil fluoreto, EDTA, inibidor de tripsina, tampão fosfato, fenóis, ácido acético triamino
Principais fontes	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , Tecido animal (estomago)	<i>Aspergillus</i> , casca de abacaxi, papáia, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , tecido animal (intestino), <i>Tritirachium album</i>

*(VISHWANATHA, 2009)

Atualmente com o avanço nos estudos das estruturas de proteína das enzimas, uma nova proposta de classificação foi criada agrupando as enzimas de acordo com sua estrutura química, ou seja, de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. A classificação e nomenclatura de todas as proteases podem ser encontradas no banco de dados MEROPS (acessível em www.merops.sanger.ac.uk/). Considerando principalmente a estrutura terciária da proteína e os seus sítios catalíticos, as proteases são inicialmente classificadas em aspártico, cisteína, glutâmica, metalo, asparagina, serina, treonina e proteases com mecanismo catalítico não reconhecido. Cada protease é então atribuída a uma família que é um conjunto de enzimas homólogas (Tabela 3). A homologia é mostrada por uma similaridade significativa na sequência de aminoácidos do tipo de enzima da família. Estas famílias são identificadas por uma letra maiúscula que representa o tipo de catalisador que a enzima possui, juntamente com um número único. Subfamílias são marcadas com uma segunda letra maiúscula. A Tabela 3 fornece alguns exemplos de diferentes famílias de serina, cisteína, metalo e aspártico peptidases, com algumas subfamílias e um exemplo de enzima representativa da família (MONOD *et al.*, 2002; VERMELHO *et al.*, 2008; RAWLINGS, BARRETT e BATEMAN, 2012; TAVANO, 2013).

Tabela 3. Classificação das proteases de acordo com a base de dados MEROPS.

Família	Subfamília	Tipo de enzima
A1	A1A	Pepsina
C1	C1A	Papaína
M1	-	Aminopeptidase
M4	-	Termolisina
S1	S1A	Quimiotripsina
S8	S8A	Subtilisina
S49	S49B	Proteína C

Estas proteínas possuem um papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, a coagulação do sangue, o crescimento e migração celular, inflamação, diferenciação de tecidos, crescimento

de tumores e metástases, liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras, ativação de neurotransmissores, bem como transporte e secreção de proteínas através da membrana (RAWLINGS, MORTON e BARRETT, 2007). De maneira geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em peptídeos para posterior absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares possuem um papel importante na regulação do metabolismo (RAO *et al.*, 1998). Além disso, recentemente, o interesse em proteases tem aumentado, visto que podem ser alvo para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BRUCE, 2004).

1.2 Aplicações Industriais

As proteases pertencem ao grupo mais importante de enzimas industriais com diversas aplicações no campo comercial. A grande especificidade na ação hidrolítica de proteases encontra uma extensa aplicação em diferentes setores, como na indústria de alimentos, detergente, couro, produtos farmacêuticos, seda, para a recuperação de prata a partir de filmes de raios-X usados e digestão de resíduos, bem como na elucidação estrutural de proteínas, enquanto que as suas capacidades de síntese são utilizadas para a síntese de proteínas (RAO *et al.*, 1998; JOHNVESLY e NAIK, 2001; GUPTA, BEG e LORENZ, 2002; ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011).

Enzimas fúngicas são comumente utilizadas na indústria, devido a várias razões técnicas, incluindo a possibilidade de obter enzimas a uma elevada concentração no meio de fermentação e oferecem uma vantagem distinta sobre as enzimas bacterianas em termos de facilitar o processamento a jusante (HAJJI *et al.*, 2010).

1.2.1 Aplicação de proteases na indústria farmacêutica e cosmética

Nas indústrias biomédica, farmacêutica e cosmética, as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas. As queratinases com atividade sobre proteínas fibrosas e insolúveis podem ser utilizadas na remoção de queratina no tratamento da acne ou

psoríase, na remoção de calosidade humana e degradação de pele queratinizada, na depilação, na preparação de vacina para a terapia de dermatofitose, e no tratamento de micoses causadas por fungos dermatófitos. Além disso, queratinases podem agir na remoção de cicatriz e regenerar os epitélios, acelerar os processos de cura, e também na medicina de trauma (VIGNARDET *et al.*, 2001; CHAO *et al.*, 2007; BRANDELLI, DAROIT e RIFFEL, 2010).

Nos produtos cosméticos as enzimas são consideradas componentes muito importantes, como as proteases que hidrolisam ligações peptídicas do colágeno e queratina da pele (SIM *et al.*, 2000). Enzimas como a papaína, bromelina e outras proteases têm sido utilizadas sobre a pele para realização de alisamento e *peeling*. A ação dessas proteases está relacionada com a renovação celular, exercendo atividade queratinolítica, promovendo a remoção das células mortas presentes na epiderme e restauração da mesma (LODS *et al.*, 2000). Proteases que apresentam atividade proteolítica sobre colágeno, queratina e elastina, são empregadas em alguns processos da indústria de cosméticos, tais como cremes esfoliantes e pomadas (GUPTA *et al.*, 2002).

As enzimas proteolíticas poderiam, também, ser aplicadas clinicamente no tratamento da doença celíaca ou enteropatia sensível ao glúten, uma vez que nesta patologia a ingestão de proteínas do glúten presente no trigo, centeio e cevada é inviabilizada em condições metabólicas normais do portador da doença. O principal componente tóxico do glúten de trigo é a proteína gliadina com regiões ricas em prolina (Pro) e glutamina (Gln). Proteases específicas em hidrolisar resíduos de prolina são chaves terapêuticas para estas doenças do sistema digestório. As prolilendopeptidases ou proliloligopeptidases pertencentes ao grupo das serino proteases, possuem a capacidade de hidrolisar a ligação peptídica na posição X-Pro ou Pro-X. Estas enzimas específicas são amplamente distribuídas em bactérias, fungos, animais e plantas (SHAN *et al.*, 2002; SHAN *et al.*, 2004).

1.2.2 Aplicação de proteases na indústria de alimentos

Proteases têm uma grande variedade de aplicações na indústria de alimentos. As principais aplicações de proteases no processamento de alimentos são na fabricação de cerveja, tritramento de cereais, na clarificação de cerveja, no

processo de coagulação do queijo, na panificação e na produção de hidrolisados de proteína (WARD, 2011). Também são utilizadas na diminuição da turbidez resultante das proteínas de sucos de frutas e bebidas alcoólicas, na melhoria da qualidade de alimentos ricos em proteínas, na preparação de hidrólidos de proteína de soja, de gelatina e caseína, na recuperação de proteína de carne e no amaciamento da carne (TOMAR, KUMAR e JAGANNADHAM, 2008; KUMARI, SHARMA e JAGANNADHAM, 2012). A principal aplicação de proteases na indústria de leite é na fabricação de queijo, cuja função principal é hidrolisar a ligação peptídica específica para gerar caseína e macropeptídeos (RAO *et al.*, 1998).

As proteases produzidas por *Mucor michei* e *Endothia parasitica* estão gradualmente substituindo a renina de animais na fabricação de queijos (DEMAIN e ADRIO, 2008). Além disso, as proteases desempenham um papel no amaciamento da carne, especialmente de carne de vaca, uma vez que possuem a capacidade de hidrolisar proteínas de tecido conjuntivo, bem como proteínas de fibras musculares (KUMAR e TAKAGI, 1999). Endo e exoproteinases de *Aspergillus oryzae* são usadas para modificar o glúten de trigo em processos de panificação. A adição de proteases reduz o tempo de mistura da massa de farinha (RAO *et al.*, 1998). As proteases alcalinas e neutras de origem fúngica desempenham um papel importante no processamento do molho de soja e em outros produtos de soja.

Os processos enzimáticos resultam em produtos com alta solubilidade, boa produção de proteína e baixo amargor. Hidrolisados proteicos comumente gerados a partir de caseína, proteína de soro de leite e proteína de soja possuem aplicações como componentes em produtos dietéticos e para saúde, nas formulações infantis, como suplementos de nutrição, em bebidas para grávidas e lactantes, para pessoas alérgicas às proteínas do leite, e como agentes aromatizantes (RAMAMURTHY, UPADHYAY e KOTHARI, 1991; RAO *et al.*, 1998; KUMAR e TAKAGI, 1999).

1.2.3 Aplicação de proteases na indústria de detergentes

O uso de enzimas como aditivos em detergentes representa a maior aplicação de enzimas industriais. Proteases utilizadas em detergentes para a roupa correspondem aproximadamente a 25% do total de vendas mundiais de enzimas (DEMAIN e ADRIO, 2008). A utilização de enzimas em formulações de detergentes

melhora a capacidade em remover manchas difíceis, fazendo com que a lavagem seja ambientalmente segura. Hoje em dia, muitos produtos detergentes de lavanderia contêm combinações de enzimas incluindo proteases, amilases, celulasas e lipases (HMIDET *et al.*, 2009).

As proteases alcalinas adicionadas aos detergentes de lavanderia permitem a liberação do material proteico de manchas. O desempenho de proteases alcalinas em detergente é influenciado por vários fatores tais como pH e temperatura da solução de lavagem, bem como a composição do detergente. As proteases utilizadas em formulações de detergentes devem possuir uma elevada atividade e estabilidade dentro de uma ampla faixa de pH e temperatura, e também deve ser compatível com os vários componentes do detergente, juntamente com agentes oxidantes e sequestrantes (KUMAR e TAKAGI, 1999; JAOUADI *et al.*, 2008; SAVITHA *et al.*, 2011).

1.2.4 Aplicação de proteases na indústria de couro

Outro processo industrial que tem recebido atenção é a utilização de proteases no auxílio da remoção de pelos em peles de animais e em pele para a indústria do couro. A fabricação de couro é um processo que tem implicações negativas provenientes dos resíduos associados ao processamento industrial. Em uma fábrica de curtumes, o couro cru é submetido a uma série de tratamentos químicos, antes do tingimento e finalmente é convertido em couro acabado. As proteases alcalinas podem desempenhar um papel vital nestes tratamentos por substituição destes produtos químicos perigosos, especialmente envolvidos na imersão, depilação e purga. O uso de enzimas para depilação não só previne problemas de poluição, mas também é eficaz na economia de tempo com melhor qualidade de couro (ZAMBARE, NILEGAONKAR e KANEKAR, 2011). Além disso, estudos demonstraram o uso bem sucedido de proteases alcalinas de *Aspergillus flavus* e *Conidiobolus coronatus* no curtume de peles (MALATHI e CHAKRABORTY, 1991; LAXMANAN *et al.*, 2005).

1.3 Produção de Proteases por Fungos

Os micro-organismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua ampla diversidade bioquímica e à sua susceptibilidade à manipulação genética, além de poderem ser facilmente cultivados em larga escala e proporcionarem altos rendimentos (KUMAR *et al.*, 2005). Como a maioria das proteases microbianas são extracelulares e são secretadas diretamente no caldo fermentado, o processo de recuperação e purificação torna-se mais simples (SAVITHA *et al.*, 2011). Por isso, a produção de enzimas de origem microbiana é um processo mais rápido, mais fácil e com menor custo. Proteases de origem microbiana representam aproximadamente 40% da venda total mundial de enzimas. Tal importância econômica justifica o interesse gerado pela busca por micro-organismos capazes de influenciar favoravelmente os processos e produtos de interesse econômico (RAO *et al.*, 1998; POZA *et al.*, 2001). As proteases microbianas são importantes porque atuam sobre diversos substratos específicos, podendo ser usadas em diversas áreas de bioquímica e biotecnologia (BARATA *et al.*, 2002).

Muitos micro-organismos secretam proteases para o ambiente externo a fim de degradar as proteínas, e seus produtos de hidrólise são utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (ZANPHORLIN *et al.*, 2011). Em uma escala industrial, proteases extracelulares são produzidas em meios complexos contendo glicose e outros substratos. As condições de cultivo são essenciais para o sucesso na produção de enzimas, e é por isso que a otimização de parâmetros como pH, temperatura e composição do meio deve ser controlada no processo de desenvolvimento (ABIDI *et al.*, 2011). A produção de protease é principalmente influenciada pela variação da relação carbono:nitrogênio (C/N), a presença de alguns açúcares facilmente metabolizáveis, tais como glicose, e íons de metal, além de vários outros fatores físicos, tais como aeração do meio, densidade do inóculo, pH, temperatura e tempo de incubação (JOO e CHANG, 2005).

Micro-organismos regulam a produção de enzimas de acordo com suas necessidades e a disponibilidade de substratos. Existem quatro tipos diferentes de mecanismos descritos para regular a síntese e secreção de proteases extracelulares: (1) a presença de um determinado substrato pode induzir a produção da protease pelo micro-organismo; (2) níveis elevados de produtos finais, tais como

aminoácidos, NH_4^+ e as fontes de carbono facilmente metabolizáveis podem reprimir a produção; (3) a produção de protease pode ser aumentada quando os níveis de carbono, de nitrogênio ou de enxofre estão insuficientemente disponíveis para o micro-organismo; e (4) as enzimas extracelulares podem ser produzidas em níveis baixos, independentemente da disponibilidade do substrato (GEISSELER e HORWATH, 2008). Além disso, a produção de proteases por micro-organismos é influenciada pela qualidade da fonte de nitrogênio. Embora as fontes de nitrogênio complexas sejam normalmente utilizadas para a produção de protease, a exigência de um substrato específico difere de organismo para organismo. Geralmente, os fungos produzem enzimas proteolíticas em fontes nitrogenadas proteicas mais complexas do que em fontes de nitrogênio inorgânico ou com baixo peso molecular (KUCERA, 1981).

As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, considerando que a produção de enzima é normalmente extracelular, tornando mais fácil a sua recuperação (GERMANOA *et al.*, 2003). Os fungos podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e atuam em ampla variedade de substrato. As proteases ácidas de importância comercial são geralmente de origem fúngica e são enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos e farmacêutica (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000).

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Alguns desses fungos são produtores de uma série de enzimas, como amilases, amiloglucosidases, celulasas, pectinases, lacases/ligninases, fitases, proteases, lipases e glicooxidases (WARD, 2011).

Fungos filamentosos, tais como os pertencentes ao gênero *Aspergillus*, são capazes de crescer em meio de cultura de baixo custo e produzir grandes quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). As proteases microbianas de espécies do gênero *Aspergillus* têm sido bastante estudadas, uma vez que são conhecidas pela sua capacidade de secretar níveis elevados de enzimas no ambiente de crescimento. Várias destas enzimas produzidas em fermentação submersa em grande escala, têm sido amplamente utilizadas na indústria ao longo de décadas (WU *et al.*, 2006). Exemplo de espécies desse gênero são *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae* (MALATHI e CHAKRABORTY, 1991; O'DONNELL

et al., 2001; MACCHIONE *et al.*, 2008; VISHWANATHA, APPU RAO e SINGH, 2010; KRANTHI, RAO e JAGANMOHAN, 2012).

Espécies de fungos do gênero *Penicillium* possuem um grande potencial para a produção biotecnológica de proteases e outras enzimas. As espécies incluem *Penicillium* sp., *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum* e *P. roqueforti*. A maioria dos fungos *Penicillium* produzem proteases alcalinas em condições de fermentação submersa. Porém, *P. griseoroseum* e *P. camemberti* são conhecidos por produzir proteases ácidas em meio líquido. A cepa *P. griseoroseum* IH-02 produziu grandes quantidades de uma protease ácida extracelular quando a fermentação foi realizada em um substrato contendo farelo de trigo e farelo de soja (IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2007).

As espécies, *Mucor pusillus* e *Mucor miehei*, secretam proteases aspárticas no meio, também conhecidas como reninas. As enzimas possuem alta atividade de coagulação do leite e baixa atividade proteolítica, permitindo que elas sejam usadas como substitutos da quimiosina de bezerro na indústria do queijo. Recentemente, foi relatada a produção de proteases extracelulares por *Mucor circinelloides*, utilizando a glicose como substrato. A enzima apresentou estabilidade em pH 5,2 e atividade máxima a 25 °C (ANDRADE, V. *et al.*, 2002).

Fungos termofílicos produzem hidrolases com características importantes, como maior estabilidade térmica, atividade ótima em temperaturas mais altas e altas taxas de hidrólise. Proteases termoestáveis, que atuam na faixa de temperatura de 65-85 °C para as bioconversões de proteínas em aminoácidos e peptídeos, possuem aplicações na área de panificação, fabricação de cerveja, detergentes e na indústria do couro (HAKI e RAKSHIT, 2003; MERHEB *et al.*, 2007). Uma fonte de protease ácida termoestável foi identificada em espécies de *Thermoascus aurantiacus* e *Thermomyces lanuginosus*. A enzima de *T. aurantiacus* foi produzida em meio contendo farelo de trigo a 60 °C (MERHEB *et al.*, 2007). A atividade ótima a temperaturas elevadas, foi mostrado por proteases termofílicas dos fungos *Thermomyces lanuginosus* (70, 50 e 45 °C) (LI, YANG e SHEN, 1997; JENSEN *et al.*, 2002; MACCHIONE *et al.*, 2008) e *Thermomucor indicae -seudaticae* (70 °C) (MERHEB-DINI *et al.*, 2010).

1.4. Processos Fermentativos

O aumento na quantidade de produtos de origem microbiana comercializados, como os produtos do metabolismo primário (álcool, ácidos orgânicos), metabólitos secundários (antibióticos), células, enzimas, entre outros, tem causado mudanças significativas nos cultivos em biorreatores (PAMBOUKIAN, 2003).

Para melhor desempenho do processo fermentativo, a condução de estudos de fermentação em *shaker*, utilizando frascos agitados, tem sido importante ferramenta para a otimização das condições para obtenção de vários produtos, incluindo as enzimas. A utilização de frascos agitados no estudo e otimização das variáveis que influenciam a obtenção de bioprodutos por processo fermentativo permite que em curto período de tempo sejam avaliadas e definidas inúmeras combinações de condições de cultivo, como: nutrientes (tipo e concentração), pH, temperatura, inóculo, etc. Geralmente, as condições definidas com os ensaios conduzidos em *shaker* são aquelas que posteriormente serão o ponto de partida dos estudos de otimização em biorreatores com maior volume (PAMBOUKIAN, 2003).

Para o estudo cinético de um processo fermentativo, diferentes componentes envolvidos no sistema de cultivo são avaliados em função do tempo de fermentação. Estes componentes consistem na biomassa, nos produtos do metabolismo e nos substratos que compõem o meio de cultura. Os valores experimentais da concentração desses componentes em função do tempo permite a construção de curvas de ajuste. Esses gráficos representam o ponto de partida para a descrição quantitativa de uma fermentação; por exemplo, permitem estabelecer a duração do processo baseando-se no instante em que as concentrações da biomassa e do produto apresentam valores máximos (HISS, 2001).

1.5. Biorreatores

Os biorreatores são equipamentos utilizados para converter substratos ou matérias-primas em produtos utilizando células vegetais, micro-organismos, células animais ou enzimas. Existem duas classes de biorreatores nos quais as reações ocorrem na ausência e presença de células vivas. Os primeiros são chamados de

biorreatores enzimáticos e os segundos utilizam a denominação de reatores bioquímicos. Outra consideração importante é que, dependendo do micro-organismo utilizado, os reatores podem apresentar distintas características, por exemplo: aqueles que empregam fungos filamentosos são distintos daqueles para bactérias e leveduras (SCHMIDELL, 2001).

Os biorreatores proporcionam condições adequadas de temperatura, pH, concentração de substrato, fontes de nutrientes e oxigênio para que células e micro-organismos produzam biomassa e os metabólitos de interesse. Em alguns casos, os biorreatores operam com elevadas concentrações celulares, como é o caso da fermentação alcoólica. Na obtenção de produtos produzidos por micro-organismos recombinantes, busca-se operar com concentrações celulares da ordem de 100 g/L, o que exige condições especiais de operação. Existem alguns fatores que influenciam na produção de compostos utilizando biorreatores, como por exemplo, tipo de catalisador (células, enzimas), configuração do catalisador (livres ou imobilizados); ou até mesmo, quanto à forma de agitar o líquido no reator. A capacidade dos biorreatores é bastante variável, conforme o processo. Existem três grupos, os reatores de até 2 litros de capacidade que são utilizados no cultivo de microrganismos patogênicos ou para o crescimento de células animais ou vegetais. Outros com uma escala intermediária na qual se opera até 200 litros, que é especialmente empregada na produção de enzimas, antibióticos e vitaminas, e finalmente para processos que exigem poucos cuidados de assepsia, como é o caso da fermentação alcoólica, utilizam-se reatores de alta capacidade (SCHMIDELL, 2001).

Os biorreatores tradicionalmente mais utilizados são os reatores agitados mecanicamente (*Stirred Tank Reactor* - STR). Normalmente estes tipos de biorreatores agitados são equipados com um sistema de quatro chicanas, diametralmente opostas, com o objetivo de evitar a formação de vórtice durante a agitação do líquido. O sistema de agitação é formado por um eixo central que possui um ou mais impelidores tipo turbina com 6 pás planas (SCHMIDELL, 2001). A agitação deste tipo de biorreator possui várias funções, como a transferência de calor, massa e movimento, além da homogeneização do meio líquido.

A forma geral em que um biorreator é operado é dividida, basicamente, em quatro processos: descontínuos, que podem ser com inóculo único ou com

recirculação de células; processos semi-contínuos e descontínuos alimentado, que podem ser com ou sem recirculação de células; contínuos, executado em um reator ou em vários reatores (com ou sem recirculação de células) (SCHMIDELL, 2001).

Na fermentação descontínua, o modo de operação se inicia quando o micro-organismo é inoculado ao meio de cultivo e inicia seu crescimento sob condições estabelecidas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto oxigênio, no caso de processos aeróbios, antiespumante, e ácido ou base para controle de pH. Neste caso, o substrato é adicionado de uma só vez e pode causar alguns efeitos de inibição ou repressão, e com isso levar a baixos rendimentos ou produtividades. No entanto, por outro lado, essa técnica é muito utilizada nas indústrias de alimentos, como iogurte, cerveja, vinho, entre outros, pois apresenta menor risco de contaminação. A fermentação descontínua é muito utilizada em escala industrial com a finalidade de otimizar a produção (SCHMIDELL, 2001).

1.6 Coeficiente volumétrico de transferência de massa (k_La)

Medir a capacidade de transferência de oxigênio em biorreator aeróbio é muito importante já que esse fator influencia a produtividade do sistema. Algumas etapas que fazem parte dessa determinação são: transporte de oxigênio da fase líquida para fase gasosa; a difusão do oxigênio na interface sólido-líquido no interior da célula; difusão intracelular; e reações bioquímicas intracelulares. Todas estas etapas ocorrem simultaneamente dentro do biorreator. A relação entre a fase líquida, o ambiente da interface, e o gradiente de oxigênio entre a interface e a fase líquida, é a velocidade de transferência, em outras palavras, o produto do coeficiente de transferência de oxigênio e da área da interface, representa a capacidade de aeração do fermentador. Alguns fatores influenciam na oxigenação dentro do biorreator, tais como: forma do biorreator, velocidade de agitação, fluxo de ar, viscosidade do meio e presença de antiespumantes. A disponibilidade de oxigênio para os microorganismos é essencial para os processos que precisam de alta taxa de aeração, seja pela rota metabólica que se deseja induzir, ou pelo tipo de produto que se deseja obter, dependendo, diferentes valores de k_La serão observados para a produção de metabólitos de interesse (ERAZO e CARDENAS, 2001).

1.7 Cerrado

O cerrado (Figura 2) é o segundo maior bioma brasileiro ocupando 23% do território nacional, abrangendo cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997). O cerrado compreende todo o Distrito Federal, os estados de Goiás e Tocantins e porções de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Maranhão e Rondônia. Cabe ainda salientar a ocorrência de manchas da vegetação de Cerrado nos estados do Pará, Amapá, Roraima, São Paulo e Paraná. O termo cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil Central (KLINK e MACHADO, 2005). A grande diversidade de espécies de animais e plantas do cerrado está associada com a não menos desprezível diversidade de ambientes. No bioma cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) seria um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies.

Figura 2. Imagem de uma planta pertencente a vegetação do cerrado.

Os ambientes do cerrado variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir em uma mesma região (MACHADO *et al.*, 2004). O clima dessa região é estacional, onde um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por

um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 18 °C e 28 °C em média, podendo chegar a 40 °C (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997; KLINK e MACHADO, 2005). Os solos da maior parte da área do cerrado são distróficos, com baixo pH e disponibilidade de cálcio e magnésio, e alto teor de alumínio (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997).

CAPÍTULO II

Triagem para seleção de fungos filamentosos produtores de proteases isolados do cerrado

Este artigo foi publicado na revista *Microbiologia in foco*, número 19, p. 17-23, 2012.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

Proteases (ou peptídeo hidrolases) são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas existentes em molécula de proteína, dando origem a peptídeos menores e aminoácidos (Rao et al., 1998). O mercado mundial de enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010, e acredita-se que a comercialização mundial dessas substâncias movimentará aproximadamente 300 a 600 milhões de dólares anualmente (ABIDI *et al.*, 2011; SAVITHA *et al.*, 2011). Dentre as industriais 75% são enzimas hidrolíticas, das quais dois terços são enzimas proteolíticas (FELIX, NORONHA e DE MARCO, 2004; SAVITHA *et al.*, 2011). As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, movimentando cerca de 3,0 bilhões de dólares, uma vez que desempenham importante papel na área da biotecnologia (GONZALEZ-RABADE *et al.*, 2011). A relevância desse grupo de enzimas, rico em diversidade estrutural e mecanismos de ação reflete na importância de suas aplicações nos processos industriais, como na indústria de alimentos, têxtil, farmacêutica, de couro e de detergentes (ZANPHORLIN *et al.*, 2011).

As proteases são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, estando presente em plantas, animais e micro-organismos (KUMARI, SHARMA e JAGANNADHAM, 2012). Muitos micro-organismos secretam proteases para o ambiente externo a fim de degradar as proteínas, e seus produtos de hidrólise são

utilizados como fontes de carbono e nitrogênio para o crescimento celular (ZANPHORLIN *et al.*, 2011). Os micro-organismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua ampla diversidade bioquímica e à sua susceptibilidade à manipulação genética, além de poderem ser facilmente cultivados em larga escala e proporcionarem altos rendimentos (KUMAR *et al.*, 2005).

As enzimas produzidas por fungos apresentam muitas vantagens, considerando que a produção de enzima é normalmente extracelular, tornando mais fácil a sua recuperação (GERMANOA *et al.*, 2003). Muitos trabalhos relatam a biossíntese de proteases pelos gêneros *Aspergillus* (YANG e LIN, 1998; KITANO *et al.*, 2002; TUNGA, SHRIVASTAVA e BANERJEE, 2003; SHATA, 2005); *Penicillium* (DURAND-POUSSEREAU e FEVRE, 1996; GERMANOA *et al.*, 2003); *Rhizopus* (FARLEY e IKASARI, 1992; KUMAR *et al.*, 2005), *Humicola* (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000); *Mucor* (ANDRADE, V. S. *et al.*, 2002); *Thermomyces lanuginosus* (LI, YANG e SHEN, 1997; JENSEN *et al.*, 2002); *Thermoascus* (MERHEB *et al.*, 2007; BOYCE e WALSH, 2012) e *Fusarium* (BARATA *et al.*, 2002). Os fungos podem produzir proteases ácidas, neutras ou alcalinas, ativas numa ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e atuam em ampla variedade de substrato.

As proteases ácidas de importância comercial são geralmente de origem fúngica e são todas enzimas extracelulares empregadas na indústria de alimentos e farmacêutica (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000). As proteases ácidas são fundamentalmente de origem fúngica, possuindo propriedades similares à pepsina ou à renina, e constituem um grupo que apresenta uma melhor atividade a valores baixos de pH (entre 2 e 5). Hidrolisam uma ampla faixa de ligações peptídicas, exibindo geralmente atividade endo e exo proteolíticas. São sensíveis a reagentes sulfidrilas, agentes quelantes e metais pesados. A estabilidade de atuação está situada, na maior parte dos casos pesquisados, na faixa de pH entre 2 e 6, sendo rapidamente inativadas a pH de valores maiores, assim como a temperaturas superiores a 50°C. Várias proteases ácidas apresentam, como característica comum, a pequena quantidade de aminoácidos básicos e baixos pontos isoelétricos, sendo que o peso molecular médio situa-se em torno de 35 kDa. Possuem uma interessante capacidade de ativar tripsinogênio a um pH entre 3 e 4. Os principais micro-organismos utilizados são do gênero *Aspergillus*.

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais incluindo produção de fermentados, metabólitos primários tais como ácidos orgânicos e vitaminas, e metabólitos secundários (antibióticos, alcalóides, giberelinas) (WARD, 2011). Além disso, os fungos filamentosos são excelentes produtores de diversas enzimas extracelulares (amilases, proteases, celulasas, pectinases, catalases, lipases, fosfatases e gluco oxidases) (VAN DEN HOMBERGH *et al.*, 1997). Fungos filamentosos são capazes de crescerem em meio de cultura de baixo custo (subprodutos sólidos agro-industriais) e produzem grandes quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

1.2 Cerrado

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando 23% do território nacional, abrangendo cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997). O cerrado compreende todo o Distrito Federal, os estados de Goiás e Tocantins e porções de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Bahia, Piauí, Maranhão e Rondônia. Cabe ainda salientar a ocorrência de manchas da vegetação de cerrado nos estados do Pará, Amapá, Roraima, São Paulo e Paraná. O termo cerrado é comumente utilizado para designar o conjunto de ecossistemas (savanas, matas, campos e matas de galeria) que ocorrem no Brasil central (KLINK e MACHADO, 2005). A grande diversidade de espécies de animais e plantas do cerrado está associada com a não menos desprezível diversidade de ambientes. No cerrado a heterogeneidade espacial (a variação dos ecossistemas ao longo do espaço) seria um fator determinante para a ocorrência de um variado número de espécies. Os ambientes do cerrado variam significativamente no sentido horizontal, sendo que áreas campestres, capões de mata, florestas e áreas brejosas podem existir em uma mesma região (MACHADO *et al.*, 2004). O clima dessa região é estacional, onde um período chuvoso, que dura de outubro a março, é seguido por um período seco, de abril a setembro. A precipitação média anual é de 1.500mm e as temperaturas são geralmente amenas ao longo do ano, entre 18°C e 28°C em média (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997; KLINK e MACHADO, 2005). Os solos da maior parte da área do cerrado são

distróficos, com baixo pH e disponibilidade de cálcio e magnésio, e alto teor de alumínio (RATTER, RIBEIRO e BRIDGEWATER, 1997).

Assim, o presente estudo teve como objetivo realizar uma triagem de fungos presente no Bioma Cerrado, visando encontrar uma espécie capaz de expressar protease em meio líquido com potencial aplicação farmacêutica. Além disso, o trabalho avaliou diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre a produção de protease ácida extracelular.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1. Isolamento dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são provenientes do solo, serrapilheira e troncos em decomposição das diferentes fitofisionomias do cerrado brasileiro, na região entre os municípios de Planaltina de Goiás, Água Fria e Padre Bernardo, que ficam na região chamada Entorno do Distrito Federal. As amostras de solo, serrapilheira e tronco foram moídas e homogeneizadas durante doze horas em um moedor de bolas, e depois trituradas num triturador elétrico SKYMSEN.

Para realizar o isolamento dos fungos foi utilizado o método de plaqueamento direto e diluição seriada em placas de Petri contendo os seguintes meios de cultura: DRCB (Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol); DG 18 (Dicloran Glicerol 18%); e Ágar Aveia 4% (20g de farinha de aveia, 12,5g de Ágar) contendo antibiótico 100 ppm (Streptomicina, Penicilina ou Tetraciclina).

A diluição seriada foi realizada pesando-se 100g de amostra de tronco moído e solo peneirado misturado com 900 mL de solução salina (NaCl 0,9%) previamente autoclavada. A diluição foi feita até 10^{-3} . Foram retiradas alíquotas de 100 µl de cada diluição (10 , 10^{-2} e 10^{-3}) para o plaqueamento direto nos meios de cultura já citados. A diluição e o plaqueamento foram feitos em triplicata. As placas de petri foram incubadas a três temperaturas 28°C, 38°C e 45°C. Aquelas contendo meio Ágar - aveia permaneceram incubadas por cerca de três dias, sendo este o tempo médio para aparecimento das colônias. Já as placas contendo meio DRCB e DG18

permaneceram incubadas entre cinco e sete dias. Ao término do tempo de incubação, foi feita a contagem das colônias e extraída a raiz quadrada do número de colônias. No valor resultante foi baseada a escolha de quantas colônias diferentes seriam repicadas para proceder ao isolamento.

Adotou-se também o procedimento de inóculo direto de pequenas quantidades de amostra de compostagem (solo, tronco e serrapilheira) em placas contendo meio de cultura como alternativa adicional ao isolamento de colônias, visto que nem sempre o plaqueamento direto das três diluições resultou em colônias numerosas.

As diferentes colônias escolhidas (tanto das placas com plaqueamento direto quanto àquelas com diluição seriada da amostra) foram submetidas a subculturas periódicas até a purificação de cada morfoespécie. Os critérios para obtenção das subculturas foram baseados na macromorfologia das colônias, como cor, textura, grau de crescimento (lento ou rápido).

Os fungos isolados foram identificados fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As 17 espécies diferentes de fungos filamentosos isolados do cerrado da região do centro-oeste brasileiro encontram-se depositados na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho. As espécies utilizadas para avaliação da produção de protease encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Fungos filamentosos isolados do Cerrado Brasileiro.

Espécies		
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Paecylomices lilacinus</i>	<i>Penicillium glandicola</i>
<i>Aspergillus foetidus</i>	<i>Paecylomices variotti</i>	<i>Penicillium restrictum</i>
<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Penicillium roqueforti</i>
<i>Fusarium solani</i>	<i>Penicillium crustosum</i>	<i>Penicillium rugulosum</i>
<i>Fusarium sp.</i>	<i>Penicillium decumbens</i>	<i>Trichoderma sp.</i>
<i>Mucor sp.</i>	<i>Penicillium fellutanum</i>	

2.2. Condições de cultivo

Os fungos previamente armazenados em glicerol a -80 °C, foram reativados em meio inclinado contendo ágar batata dextrose (BDA), e incubados a 28 °C por 7 dias até completo crescimento. O micélio foi suspenso em aproximadamente 5 mL de solução esterilizada composta de 0,9% NaCl e Tween 80. Esta suspensão micelial (10^8 esporos/mL) foi inoculada em Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo (3% (p/v) caldo Sabouraud, 2% (p/v) peptona e 1% (p/v) leite desnatado). As culturas foram incubadas durante 7 dias à 28 °C. Após incubação as culturas foram filtradas e o filtrado foi utilizado para a quantificação da atividade proteolítica.

2.3. Triagem para atividade de proteases

Os estudos de seleção dos fungos produtores de proteases foram realizados em placas de Petri contendo 10% de leite desnatado em ágar (PEREIRA, CRESPO e ROMAO, 2001; GEOK, 2003; SARAN, ISAR e SAXENA, 2007). O ágar foi adicionado em tampão citrato-fosfato 0,1 M (pH 5,0) e esterilizado separadamente do leite, a fim de evitar a coagulação e caramelização dos seus componentes, e posteriormente o leite foi adicionado ao ágar sob condições assépticas. O meio preparado foi vertido ainda quente em placas de Petri, sendo 20 mL por placa. Cada cultivo mantido durante 7 dias à 28 °C foi inoculado na superfície de uma placa de Petri. A leitura das placas foi feita após 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as placas foram analisadas e os fungos produtores de proteases foram confirmados com a formação e visualização de um halo ao redor das colônias. Foi considerado como produtor de protease todo fungo que ao redor do crescimento do seu micélio formasse um halo.

2.4. Determinação da atividade proteolítica

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por (CHARNEY e TOMARELLI, 1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 500 µL do filtrado a 37 °C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

2.5. Produtividade

A partir dos dados obtidos foi determinada a produtividade de acordo com a Equação 1:

$$P = \frac{\Delta U}{t} \quad (1)$$

onde, U é a atividade enzimática e t é o tempo em horas (h).

3. RESULTADOS

3.1 Seleção de fungos filamentosos produtores de proteases

Na literatura encontram-se diferentes métodos desenvolvidos para detectar a produção de enzimas por espécies de micro-organismos em meio de cultura sólido. A vantagem na determinação enzimática em meio sólido deve-se principalmente à análise de numerosas espécies de fungos, as quais crescem com predominância em substrato sólido. Como método qualitativo, a vantagem do uso da incorporação de diferentes substratos em ágar nutriente consiste na sua simplicidade e baixo custo (TEIXEIRA *et al.*, 1996).

No processo de tecnologia de fermentação, os fungos filamentosos têm sido utilizados como produtores de diferentes metabólitos primários, incluindo ácidos orgânicos, como ácido cítrico, glutâmico e kójico e ácidos graxos. Também são importantes produtores de metabólitos secundários, especialmente utilizados na terapêutica, por exemplo a penicilina, cefalosporina, lovastatina e taxol. Além disso, os fungos filamentosos são utilizados como produtores de uma série de enzimas, tais como amilases, celulasas, pectinases, lipases e proteases (WARD, 2011).

Inicialmente, a produção de protease extracelular pelos fungos filamentosos foi verificada em placas contendo ágar-leite, após um período de 24 horas à temperatura de 28 °C. Dessa forma, foram avaliadas neste trabalho 17 espécies diferentes de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma*.

Dentre as espécies analisadas 8 fungos não apresentaram formação do halo ao redor das colônias apesar do crescimento observado. No entanto, 9 espécies de fungos filamentosos isolados do solo de Brasília apresentaram formação de halo claro ao redor das colônias nos ensaios para detecção da produção de protease em meio de cultivo sólido contendo caseína de leite. Estas espécies foram: *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus versicolor*, *Fusarium solani*, *Paecilomyces variotti*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium decumbens* e *Penicillium restrictum* (Figura 3).

Figura 3. Espécies de fungos filamentosos que apresentaram formação de halo em Ágar-leite. (1) *Aspergillus foetidus*; (2) *Aspergillus versicolor*; (3) *Fusarium solani*; (4) *Paecilomyces variotti*; (5) *Penicillium citrinum*; (6) *Penicillium crustosum*; (7) *Penicillium decumbens*; (8) *Penicillium fellutanum*; (9) *Penicillium restrictum*.

Da mesma forma, RODARTE *et al.* (2011) avaliaram a produção de protease de fungos filamentosos utilizando placas de Petri contendo ágar-leite. Dentre os 66 isolados de fungos filamentosos submetidos ao teste qualitativo para hidrólise da caseína, espécies do gênero *Aspergillus*, *Fusarium*, *Paecilomyces* e *Penicillium* apresentaram a formação de halo claro ao redor da colônia, caracterizando-os como produtores de proteases. Dentre as espécies avaliadas, os autores também encontraram formação de halo de hidrólise de caseína nos fungos *Fusarium solani*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium citrinum*, *Penicillium crustosum*, *Penicillium fellutanum* (RODARTE *et al.*, 2011). Halo de hidrólise de caseína já foi observado para a espécie *Penicillium decumbens* isolada do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) (SILVA *et al.*, 2011). Apesar da espécie *Aspergillus*

foetidus não ter apresentado a formação do halo claro no estudo feito por (RODARTE *et al.*, 2011), no presente estudo a mesma espécie demonstrou ser um bom produtor de protease.

Dessa forma, os resultados obtidos no teste qualitativo para a seleção de fungos filamentosos proteolíticos também mostraram que espécies diferentes ou mesmo isolados diferentes de uma mesma espécie podem apresentar resultados diferentes com relação à produção de proteases, ou seja, a produção da enzima é específica para um isolado e não para uma determinada espécie (BRAGA, DE MORAIS e LINARDI, 1998; ADINARAYANA e ELLAIAH, 2002; RODARTE *et al.*, 2011).

3.2. Avaliação de fontes de carbono e nitrogênio para produção de protease

As 9 espécies de fungos filamentosos que apresentaram qualitativamente produção de proteases foram avaliadas quanto à atividade proteolítica. A metodologia escolhida para essa avaliação utilizou como substrato a azocaseína. O método para determinação da atividade proteolítica de enzimas utilizando azocaseína como substrato foi demonstrado por Charney & Tomarelli (1947). A azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, que tem coloração alaranjada. A digestão de uma solução de azocaseína por enzimas proteolíticas resulta na formação de componentes coloridos solúveis em ácido tricloroacético. A intensidade da cor desenvolvida no sobrenadante, resultante da centrifugação do substrato digerido após a adição do ácido tricloroacético, é função da atividade proteolítica da enzima na solução (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Alguns autores consideram a azocaseína como um dos melhores substratos utilizados para a dosagem de atividade de proteases, devido a sua maior solubilidade (BENDICHO *et al.*, 2002). Porém, a capacidade do organismo em utilizar vários tipos de substratos (caseína, azocaseína, hemoglobina, gelatina ou BSA) deve-se às diferenças nas especificidades do substrato da enzima produzida, ou pode ser consequência de parâmetros que afetam a produção da enzima protease, como composição do meio, pH e temperatura (VERMELHO *et al.*, 1996; CORZO, WALISZEWSKI e WELTI-CHANES, 2011). Ou seja, a quantificação

da atividade enzimática de protease dependerá do substrato utilizado e do tipo de protease que o organismo é capaz de produzir.

A produção de proteases depende da disponibilidade de carbono e fontes de nitrogênio do meio e ambos os parâmetros exercem efeitos reguladores sobre a síntese da enzima. Muitos estudos avaliam a indução da produção de proteases, utilizando glicose, adicionada à fontes de nitrogênio, tais como extrato de levedura, caseína ou peptona (HADDAR *et al.*, 2010). Laxman e colaboradores demonstraram que extrato de levedura, peptona e caseína eram as melhores fontes de nitrogênio orgânico para produção de protease (LAXMAN *et al.*, 2005). As fontes de nitrogênio orgânico utilizadas em outro estudo promoveu um efeito máximo sobre o crescimento do micro-organismo utilizando como substrato a combinação de peptona e extrato de levedura, e a maior produção enzimática ocorreu com caseína ácida no meio (PATEL, DODIA e SINGH, 2005).

Como as proteases ácidas são bastante utilizadas na indústria farmacêutica, a seleção dos fungos foi feita quanto à produção de proteases com atividade em pH ácido. Os 9 fungos foram cultivados em meio contendo caldo Sabouraud e leite desnatado, e as melhores atividades proteolíticas em pH 5,0, nas condições do experimento, foram apresentadas pelas espécies *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus versicolor*, *Paecylomices variotti*, *Penicillium fellutanum*, *Penicillium decumbens* e *Penicillium restrictum* (Figura 4).

Espécies de *Penicillium* possuem grande potencial biotecnológico para a produção de proteases e outras enzimas. As proteases extracelulares expressas pelos fungos *Penicillium fellutanum*, *Penicillium decumbens* e *Penicillium restrictum* apresentaram atividades iguais a 19,55 U/mL, 15,65 U/mL, 6,30 U/mL, respectivamente. Em outro estudo, a espécie *Penicillium fellutanum* quando cultivada em pH 8,5 obteve uma atividade de 25 U/mL (MANIVANNAN e KATHIRESAN, 2007). O fungo *P. restrictum* quando cultivado em meio sólido apresentou atividade proteolítica igual a 7,8 U/mL (GOMBERT *et al.*, 1999). Apesar do fungo *P. citrinum* quando incubado por 7 dias em leite desnatado não apresentou atividade enzimática. Entretanto, em outro estudo, foi observada atividade proteolítica igual a 10,89 U/mL em pH 5,0 na mesma espécie quando cultivada em meio contendo caseínato de sódio (RODARTE *et al.*, 2011). Outros estudos também caracterizaram a produção de protease pela espécie *Penicillium citrinum*

(YAMAGUCHI *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1993). A espécie *Fusarium solani* também mostrou baixa atividade proteolítica (2,15 U/mL) em pH ácido, sendo que resultados similares de isolados da mesma espécie apresentaram atividade enzimática em pH neutro (GOPINATHAN *et al.*, 2001; OLIVIERI *et al.*, 2002; RODARTE *et al.*, 2011; KANNAHI e ANCY, 2012).

As espécies do gênero *Aspergillus* são de grande importância para a biotecnologia devido a sua alta capacidade de produzir diferentes tipos de proteases. Os isolados das espécies *Aspergillus versicolor* e *Aspergillus foetidus* apresentaram atividades proteolíticas em pH 5 iguais a 18,73 U/mL e 12,91 U/mL, respectivamente. Recentemente, estudos demonstraram que a espécie *Aspergillus flavus* apresentou atividades enzimáticas, sendo que sua produção depende da fonte de carbono e nitrogênio do meio (KANNAHI e ANCY, 2012; KRANTHI, RAO e JAGANMOHAN, 2012). Em um estudo sobre a produção de protease ácida pelo fungo *Aspergillus oryzae*, a adição de fontes de proteína como caseína e peptona, também aumentou a atividade de protease (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2010).

Com base na literatura e considerando o alto valor agregado do leite desnatado como substrato de fonte de proteína, um meio de cultivo mais barato foi utilizado para avaliar a produção de protease. Os mesmos 9 fungos analisados anteriormente, *A. versicolor*, *A. foetidus*, *F. solani*, *P. variotti*, *P. citrinum*, *P. crustosum*, *P. decumbens*, *P. fellutanum* e *P. restrictum*, utilizando como substrato 3% (p/v) de caldo Sabouraud, 2% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de extrato de levedura e 1% (p/v) de caseína. Os fungos foram incubados a 28 °C, em 150 rpm por 7 dias. Após 7 dias de incubação, a espécie *A. foetidus* mostrou a maior atividade proteolítica (40,13 U/mL). Os fungos *F. solani*, *P. variotti*, *P. fellutanum*, *P. decumbens* e *P. restrictum* também apresentaram produção de protease, porém com os valores de atividade menores que 20 U/mL (Figura 4).

Na Tabela 5, a produtividade de protease dos fungos filamentosos é apresentada após 168 horas de cultivo. A maior produtividade para proteases neste trabalho foi observada pela espécie de fungo *A. foetidus* com 0,24 U/h utilizando como fonte de carbono e nitrogênio 3% (p/v) de caldo Sabouraud, 2% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de extrato de levedura e 1% (p/v) de caseína.

Figura 4. Atividade proteolítica das 9 espécies de fungos filamentosos, utilizando como substrato azocaseína em pH 5. Condições de cultivo: Meio 1 contendo caldo Sabourad 3% (p/v) e leite desnatado 2% (p/v) e Meio 2 contendo caldo Sabourad 3% (p/v), peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v) e extrato de levedura 1% (p/v), a 28 °C e 150 rpm. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Tabela 5. Produtividade obtida pelos 9 fungos filamentosos após 168 h de cultivo.

Fungo filamentoso	Produtividade (U/h)	
	Meio 1 ^a	Meio 2 ^b
<i>Aspergillus versicolor</i>	0.11	0.02
<i>Fusarium solani</i>	0.01	0.10
<i>Paecilomyces variotti</i>	0.05	0.07
<i>Penicillium fellutanum</i>	0.12	0.08
<i>Penicillium decumbens</i>	0.09	0.04
<i>Penicillium restrictum</i>	0.04	0.04
<i>Aspergillus foetidus</i>	0.08	0.24
<i>Penicillium citrinum</i>	0.00	0.01
<i>Penicillium crustosum</i>	0.02	0.01

^a Meio 1 contendo caldo Sabourad 3% (p/v) e leite desnatado 2% (p/v) e ^b Meio 2 contendo caldo Sabourad 3% (p/v), peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v) e extrato de levedura 1% (p/v), a 28 °C e 150 rpm.

4. CONCLUSÃO

Após a triagem realizada quanto à capacidade de produção de protease de 17 fungos filamentosos isolados de Cerrado brasileiro demonstrou que nove espécies apresentavam atividade proteolítica em meio de cultura contendo Ágar-leite. O fungo *A. foetidus* apresentou a melhor atividade enzimática quando o pH do meio de cultivo estava ácido. Além disso, o fungo *A. foetidus* apresentou maior produção de protease quando cultivado em substratos, como extrato de levedura, caseína e peptona. Dessa forma, considerando o perfil de indução para a produção de protease ácidas extracelulares das espécies estudadas, relacionando a atividade enzimática e a produtividade dessas proteases presentes em meio líquido, a espécie *A. foetidus* foi selecionada para o estudo de otimização da produção de protease ácida extracelular.

CAPÍTULO III

Avaliação das condições de cultivo submerso para a produção de proteases pelo fungo *Aspergillus foetidus* isolado do solo da savana brasileira

RESUMO

A partir da triagem realizada com 17 espécies de fungos filamentosos isolados do cerrado brasileiro, o fungo *Aspergillus foetidus* foi selecionado como o melhor produtor de protease ácida extracelular. Diferentes condições de cultivo foram avaliadas sob fermentação submersa utilizando várias fontes de carbono e nitrogênio. Uma atividade máxima de protease (63,7 U/mL) foi observada em meio contendo 2% (p/v) peptona (pH 7,0) e incubado a 28 °C e 150 rpm por 168 h. A grande parte de protease foi secretada na fase estacionária do crescimento, e a concentração inicial de glicose e a fonte de nitrogênio influenciaram significativamente o crescimento celular e a produção de enzima. Uma avaliação comparativa do rendimento da produção de protease sob as melhores condições demonstrou uma produção da enzima de cerca de 20 vezes maior que o obtido com as outras condições de cultivo. Estes resultados são bastante promissores para o futuro desenvolvimento da produção em larga escala de protease ácida pelo fungo *A. foetidus*.

Palavras-chave: Protease ácida; *Aspergillus foetidus*; Fermentação submersa.

1. INTRODUÇÃO

Proteases de microrganismos são enzimas industriais importantes no Mercado mundial, sendo responsável por aproximadamente 60% do total do mercado de enzimas no mundo (SAVITHA *et al.*, 2011). Proteases (EC 3.4.11-24) são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas das proteínas e podem ser classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada no sítio

ativo, bem como de acordo com o pH ótimo de atividade (protease ácida, neutra ou alcalina) (RAO *et al.*, 1998). Proteases ácidas comercialmente importantes são produzidas principalmente por fungos filamentosos, e a demanda industrial para essas enzimas está crescendo rapidamente em diversas áreas específicas (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000). Elas são utilizadas em diferentes processos industriais tais como no processamento do couro (KANTH *et al.*, 2009) e de alimentos (TAVANO, 2013), bem como na indústria farmacêutica (BRANDELLI, DAROIT e RIFFEL, 2010). Recentemente, proteases ácidas foram identificadas na pele e associadas ao processo de descamação, e algumas delas com capacidade para induzir a esfoliação estão entre os potenciais compostos ativos nos produtos cosméticos (BERNARD *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2007).

Os fungos são comumente utilizados na indústria por diversas razões técnicas, incluindo a sua capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas extracelulares e ao status GRAS (*generally recognized as safe*). Eles também oferecem uma vantagem distinta sobre bactérias, entre as quais a facilidade no processo *downstream*, menores custos de material, maior produtividade, produção mais rápido e facilidade a modificação de enzimas (HAJJI *et al.*, 2010; VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2010).

Produção extracelular de proteases por fungos e a suas atividades são fortemente influenciadas pela composição do meio, especialmente fontes de carbono e de nitrogênio, bem como de fatores físico-químicos, tais como temperatura, pH, tempo de incubação e agitação (BELMESSIKH *et al.*, 2013); portanto, sua otimização é de suma importância para o sucesso do processo. Para este fim, deve ser notado que cada organismo tem as suas próprias condições ótimas específicas para o rendimento máximo de enzima e assegurar que estes são essenciais para manter um equilíbrio entre os diversos componentes, minimizando, assim, as quantidades de substratos não utilizados no final da fermentação (SANDHYA *et al.*, 2005; HADDAR *et al.*, 2010).

Levando em conta a grande variedade de aplicações industriais das proteases, bem como a importância de identificar enzimas estáveis, o objetivo deste trabalho foi avaliar as condições necessárias para o crescimento e produção de proteases ácidas extracelulares pelo fungo filamentoso *Aspergillus foetidus* isolado

do solo do cerrado brasileiro, destinadas a aplicação industrial em cosméticos e produtos farmacêuticos.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Azocaseína e ácido tricloroacético (TCA) foram adquiridas pela Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os meios de cultivo utilizados foram peptona da Merck (Darmstadt, Alemanha), caldo Sabouraud e caseína da Acumedia Neogen Co. (Lansing, MI, EUA), e agar batata dextrose (PDA) e extrato de levedura da HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. (Mumbai, Índia).

2.2. Micro-organismo

A cepa de *Aspergillus foetidus* foi identificada fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esta cepa foi isolada do cerrado da região do centro-oeste brasileiro e encontra-se depositada na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

2.3. Produção de proteases

A cepa do fungo *A. foetidus*, a qual exibiu a maior produção de protease ácida, foi mantida em meio PDA 4.0% (p/v) e incubada a $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias até completo crescimento. Discos de 8 mm de diâmetro de ágar micélio obtidos do pré-

cultivo em placa de Petri foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio. O crescimento e a produção de biomassa foram avaliados em diferentes condições.

Na primeira parte dos experimentos, o micro-organismo foi cultivado por 168 h a 28 °C e 150 rpm em meio PYCS contendo a seguinte composição: 3% (p/v) caldo Sabouraud, 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) caseína e 1% (p/v) extrato de levedura, com pH inicial do meio igual a 6.0. Para determinar a produção de protease, pH do meio, concentração de glicose e biomassa, amostras foram retiradas a cada 12 h durante os primeiros 3 dias de incubação e, em seguida, a cada 24 h. A concentração de biomassa fúngica foi determinada por peso seco e a glicose pelo método de MILLER (1959), utilizando como reagente colorimétrico o ácido dinitrosalicílico (DNS).

A outra parte dos experimentos, realizada sob a melhor condição para identificar a melhor fonte de nitrogênio, foi realizada usando 2% (p/v) de peptona, com um pH inicial do meio igual a 7,0 a 28 °C e 150 rpm. As amostras foram retiradas a cada 24 horas durante 9 dias para se determinar a produção de proteases, pH final do meio e concentração de biomassa. O extrato foi separado da biomassa por filtração a vácuo com papel de filtro Whatman nº1 no funil de Buchner, e o sobrenadante foi usado como fonte de protease.

2.4. Determinação da atividade de proteases

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 500 µL do filtrado a 37°C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste,

característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

2.5. Efeito da velocidade de agitação, temperatura e pH do meio na produção de proteases

Primeiramente, a influência dos parâmetros de processo na produção de protease foi estudada em meio PYCS por 168 h variando a velocidade de agitação (90, 120 e 150 rpm), a temperatura de incubação (28 - 36 °C) e o pH inicial do meio (5,0 - 7,0).

Posteriormente, um desenho fatorial 2^3 com ponto central e pontos axiais foi utilizado para avaliar a significância da temperatura de incubação (24 - 44 °C), do pH inicial do meio (4,0-9,0) e da concentração de carbono e nitrogênio na produção de protease em meio PYCS. O software Design Expert versão 9.0.3 foi utilizado para a regressão e análise gráfica dos dados. A significância estatística dos coeficientes de regressão foi determinada pelo teste *t* de *Student*. A análise estatística dos dados foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA).

2.6. Seleção da melhor fonte de carbono e nitrogênio

A triagem das fontes de carbono e de nitrogênio que permitam a produção máxima de protease foi realizada por via de uma variável-a-um-tempo. As fontes de nitrogênio orgânico testadas foram 2% (p/v) de peptona, 2% (p/v) de caseína e 1% (p/v) de extrato de levedura, enquanto que a principal fonte de carbono foi 3% (p/v) de glicose contida no caldo Sabouraud. Estas fontes de carbono e nitrogênio foram

adicionados de acordo com oito combinações diferentes: peptona e caldo Sabouraud (PS); peptona, extrato de levedura e caldo Sabouraud (PYS); peptona, extrato de levedura, caseína e caldo Sabouraud (PYCS); peptona, caseína e caldo Sabouraud (PCS); caseína e caldo Sabouraud (CS); peptona e extrato de levedura (PY); peptona (P); e caseína (C). Após autoclavagem a 120 ° C durante 15 min, 50 mL de cada meio foram colocados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, inoculadas com discos de micélio (4 mm) e incubados a 150 rpm durante 168 h. Os meios de cultura e micélio foram filtrados a vácuo através de papel de filtro (Whatman N ° 1) no funil de Buchner, e o sobrenadante foi usado como o extrato enzimático. A concentração de biomassa fúngica foi determinada por peso seco.

2.7. Composição química dos meios de cultivo

As concentrações de carbono e nitrogênio dos meios de cultivo foram determinadas no Centro Analítico do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), utilizando um Analisador Elementar CHN, série 2400 II System (Perkin Elmer, Norway, CT, EUA). Estes testes, bem como os descritos na seção anterior foram realizados em duplicata, e os resultados expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão (SD).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Crescimento e produção de protease pelo fungo *A. foetidus*

O crescimento e a produção de protease extracelular do fungo foram avaliados. A Figura 5 apresenta o comportamento das concentrações de biomassa e glicose (A), o pH final do meio (B), e a atividade de protease extracelular (C) dos cultivos contendo meio PYCS. Nota-se uma fase de crescimento, onde a biomassa aumentou alcançando uma concentração máxima de 23,73 g/L, após 144 h, seguida pelas fases estacionárias e de declínio.

A glicose foi quase completamente consumida (4,14 - 0,4 g/L) dentro de 36 h, e observou-se que a produção de protease ocorreu quando a concentração de glicose do meio já se encontrava esgotada. A presença de glicose em altas concentrações no meio de cultivo pode induzir uma repressão catabólica no microrganismo produtor de protease (HADDAR *et al.*, 2010). Além disso, as proteases extracelulares catalisam a liberação de aminoácidos do meio de cultivo tanto para a síntese de proteínas fúngicas como para a produção de energia pelo metabolismo das proteínas. Desta forma, a provável redução de carbono do meio de cultivo, após o 36 h, pode ter induzido a síntese de proteases exógenas para a liberação do carbono proteico e produção de energia.

A Figura 5 (B) mostra que durante o crescimento celular houve uma queda no pH do meio de cultura a partir de pH 6,5 para pH 4,3, e em seguida, elevou-se gradualmente para 5,7 durante a secreção de enzimas, permanecendo relativamente inalterado até 192 h de fermentação; mas, logo que a produção enzima começou a diminuir, houve a elevação do pH para 6,2. Essas mudanças de pH podem estar relacionadas com a utilização de ácidos orgânicos ou a produção de compostos alcalinos, durante este período de tempo. Isto pode ser atribuído ao consumo de glicose, e consequentemente, a produção de ácidos durante a fase de crescimento do fungo. Um comportamento similar foi observado por PAPAGIANNI e MOO-YOUNG (2002) durante a produção de protease pelo fungo *Aspergillus niger* no meio contendo extrato de levedura, extrato de malte, peptona e dextrose, onde o pH diminuiu de 5,5 para 3,5 após 40 h de cultivo, e então permaneceu inalterado.

Figura 5. (A) Concentração de biomassa (■), concentração de glicose (○), (B) pH do meio e (C) atividade de protease durante o cultivo submerso de *A. foetidus* a 28 °C e 150 rpm em meio PYCS com pH inicial de 6,1.

Como apresentado na Figura 5 (A e C), a produção de enzima não foi associada com o crescimento, e sua atividade atingiu um valor máximo (29.75 ± 0.37 U/mL) na fase estacionária após 168 h e então diminuiu ligeiramente para aproximadamente 25 U/mL após 240 h. Este comportamento é consistente com outros trabalhos sobre a produção de protease microbiana. Para fornecer apenas alguns exemplos, a produção de protease por *Sporisorium sclerotiorum* atingiu um valor máximo após 96 h durante a fase estacionária de crescimento, sob condições ácidas (MANDUJANO-GONZALEZ *et al.*, 2013). Da mesma forma, os fungos *A. niger* (PAPAGIANNI e MOO-YOUNG, 2002) e *A. fumigatus* (FARNELL *et al.*, 2012) exibiram máxima produção de protease na fase estacionária após 144 h e 48 h de fermentação, respectivamente.

3.2. Efeitos da temperatura, velocidade de agitação e pH do meio na produção de proteases

Um conjunto de experimentos adicionais foi realizado para estudar os efeitos de diferentes parâmetros de cultivo sobre a produção de proteases, assim como para determinar a temperatura e o pH ótimos para os testes subsequentes.

Como descrito na literatura, a velocidade de agitação e a temperatura são parâmetros que influenciam significativamente tanto a morfologia bem como a produtividade dos fungos filamentosos. Dessa forma, os efeitos combinados destes parâmetros foram investigados variando simultaneamente a velocidade de agitação de 90 - 150 rpm e a temperatura de 28 a 36 °C. Como apresentado na Figura 6, as atividades mais elevadas de protease foram obtidas a 150 rpm, nas temperaturas de incubação iguais a 28 e 32 °C ($43,65 \pm 1,52$ e $40,38 \pm 5,78$ U/mL, respectivamente), enquanto que a produção de proteases era significativamente inferior sob as outras condições de agitação de velocidade (90 e 120 rpm). No entanto, nenhuma diferença significativa na produção da enzima foi observada variando a temperatura de incubação. EL-ENSHASY, KLEINE e RINAS (2006) observaram que um aumento na velocidade de agitação mudou a morfologia do fungo *A. niger*, da forma de pellet para a forma de filamentos, e simultaneamente aumentou sua produção de proteínas extracelulares.

Figura 6. Efeito da temperatura e da velocidade de agitação na atividade de protease extracelular do fungo *A. foetidus*. Valores são as médias de triplicatas $\pm$ desvio padrão. Condições de cultivo: meio PYCS com pH inicial de 7.0. *As diferenças significativas relacionadas com a velocidade de agitação ($p < 0,05$) foram encontrados por *one way* ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

Com base nos resultados obtidos pelas fermentações realizadas anteriormente, o efeito combinado de três fatores, a temperatura, o pH do meio e a relação C/N, foi encontrado como as principais variáveis na produção de protease pelo fungo *A. foetidus*. Dessa forma, com o objetivo de avaliar a influência desses parâmetros, um planejamento experimental foi elaborado para avaliar o efeito da temperatura, do pH inicial do meio e das concentrações de carbono e nitrogênio sobre a produção de proteases (Tabela 6). Para isso, foi construído um planejamento fatorial 2^3 com pontos axiais, utilizando como variáveis independentes temperatura de incubação (24 - 44 °C), pH inicial do meio (4,0 - 9,0) e razão C/N (1-8) em meio PYCS, e variável dependente a produção de proteases. Apesar de um esquema fatorial com dois níveis assumir linearidade nos efeitos dos fatores, os pontos axiais foram adicionados para viabilizar o modelo quadrático para representar uma parte da torção que existe no plano.

Tabela 6. Níveis das variáveis independentes para estudar a influência de pH, temperatura e relação C/N na produção de protease pelo fungo *A. foetidus*.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura °C	X_1	24	28	34	38	44
pH	X_2	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0
C/N	X_3	1	2	4	6	8

Tabela 7. Resultados experimentais da atividade de protease obtidas a partir do planejamento fatorial 2^3 . Variáveis independentes: pH, temperatura e relação C/N.

Ensaio	Níveis			Atividade de Proteases (U/mL)
	X_1	X_2	X_3	
1	-1	-1	-1	11,25
2	-1	-1	+1	3,25
3	-1	+1	-1	9,33
4	-1	+1	+1	15,43
5	+1	-1	-1	29,63
6	+1	-1	+1	11,88
7	+1	+1	-1	30,18
8	+1	+1	+1	15,00
9	0	0	0	38,80
10	0	0	0	36,20
11	0	0	0	37,15
12	0	0	-1,68	6,18
13	0	0	+1,68	19,08
14	0	-1,68	0	24,50
15	0	+1,68	0	32,65
16	-1,68	0	0	10,28
17	+1,68	0	0	3,30

Como pode ser visto na Tabela 7, a atividade da protease exibiu uma ampla variação de (3,25 - 37,15 U/mL), o que reflete a importância da otimização do meio para se obter uma produtividade elevada. Baseando-se nos valores *t* e *p* da análise de variância (ANOVA) (Tabela 8), a temperatura (X_1), pH inicial (X_2), a interação

entre a temperatura e a relação C/N (X_1X_3) e o quadrado da temperatura (X_1^2), foram encontrados como as variáveis mais importantes que influenciam a produção de proteases, enquanto que a relação C/N (X_3) não foi significativa.

A ANOVA revelou um valor de F de 9,06, o que indica que o modelo foi significativo. No entanto, o baixo coeficiente de determinação ($R^2 = 0,7057$) e um valor de p para a falta de ajuste significativo ($p > 0,05$) indicam que o modelo proposto não era adequado para a região experimental analisada.

Tabela 8. Análise da variância (ANOVA) para o modelo quadrático utilizado na otimização da produção de protease.

Source	SS	DF	MS	F -value	p -value
Block	19.76	1	19.76		
Model	3449.45	9	383.27	9.06	<0.0001*
A: Temperatura	194.46	1	194.46	4.60	0.0393*
B: pH	247.75	1	247.75	5,86	0,0210*
C: C/N	10.42	1	10.42	0.25	0.6228
AB	0.14	1	0.14	3.371 E-003	0,9540
AC	230.08	1	230.08	5.44	0,0258*
BC	40.85	1	40.85	0.97	0,3327
A^2	1918..88	1	1918..88	45.36	<0.0001*
B^2	123.74	1	123.74	2.92	0.0963
C^2	1228.42	1	1228.42	29.04	<0.0001*
Lack of fit	1188.13	4	297.03	35.60	<0.0001*
Pure error	250.29	30	8,34		

SS = soma de quadrados; DF = grau de liberdade; MS = quadrado médio; $R^2 = 0.7057$. * Nível de significância de 95%.

Embora a maioria das variáveis tenha afetado significativamente a produção de protease, a triagem realizada de acordo com o planejamento fatorial 2^3 não resultou em níveis desejados de produção de protease. Os maiores níveis de atividade de protease detectadas nesse experimento foram inferiores aos obtidos com outras espécies de *Aspergillus* relatados na literatura. Por exemplo, *A. tamaritii* e *A. niger* demonstraram uma produção de protease máxima de 120,0 e 172,7 U/ml, respectivamente (BOER e PERALTA, 2000; MAZOTTO *et al.*, 2013), enquanto que a espécie *A. terreus* também foi capaz de produzir grandes quantidades de enzimas

(85 U/mL) em meio rico em proteína (WU *et al.*, 2006). Mesmo utilizando pontos axiais longe dos pontos experimentais centrais para temperatura, pH inicial do meio e a relação C/N, todas as atividades obtidas foram menores do que aquelas encontradas na literatura. A Figura 7 apresenta o gráfico da resposta de superfície, onde pode ser claramente observado uma baixa atividade de protease obtida sob as variáveis testadas.

Figura 7. Gráfico de superfície de resposta para a atividade de protease (U/mL) em função da temperatura (X_1) (°C) e pH inicial do meio (X_2).

Dessa forma, o estudo foi direcionado para encontrar outras formas para a avaliação das fontes de carbono e nitrogênio adequados, com o objetivo de aumentar a produção de protease para valores próximos aos relatados na literatura para outros fungos.

3.4. Efeito das fontes de carbono e nitrogênio na produção de protease

Tem sido relatado que a produção de protease depende da disponibilidade de carbono e de nitrogênio no meio, ambos exercendo efeitos reguladores sobre a síntese da enzima. No entanto, a capacidade de utilizar uma dada fonte de carbono ou de nitrogênio difere de um micro-organismo para outro. Espécies de *Aspergillus* utilizam uma grande variedade de substratos para seu crescimento e possuem diferentes vias bioquímicas para a sua assimilação (HAJJI *et al.*, 2008). Baseado nessas considerações, experimentos adicionais foram realizados para avaliar a produção de protease pelo fungo *A. foetidus* em diferentes fontes complexas de carbono e nitrogênio. Para este fim, os cultivos foram realizadas a 28 °C e 150 rpm (Figura 8), em meios contendo várias combinações de caseína, peptona, extrato de levedura e caldo Sabouraud com pH inicial do meio igual a 7,0.

Figura 8. Produção de protease pelo fungo *A. foetidus* (barras) e pH final do meio (■) em diferentes fontes de carbono e nitrogênio: peptona e caldo Sabouraud (PS); peptona, extrato de levedura e caldo Sabouraud (PYS); peptona, extrato de levedura, caseína e caldo Sabouraud (PYCS); peptona, caseína e caldo Sabouraud (PCS); caseína e caldo Sabouraud (CS); peptona e extrato de levedura (PY); peptona (P); e caseína (C). Condições de cultivo: 28 °C, 150 rpm, 168 h. As diferenças significativas (* $p < 0,05$) foram encontrados por *one way* ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

Mesmo que todas as fontes de carbono e nitrogênio testadas neste estudo foram capazes de suportar o crescimento do fungo, o melhor efeito sobre o crescimento foi observado com nos meios contendo as combinações de peptona e caldo Sabouraud (PS), e peptona, extrato de levedura e caldo Sabouraud (PYS), enquanto que o meio contendo somente peptona (P) exibiu o melhor efeito sobre a produção de proteases ($61,3 \pm 1,06$ U/mL), seguido do meio com peptona, caseína e caldo Sabouraud (PCS) ($47,1 \pm 1,06$ L / mL) e peptona e extrato de levedura (PY) ($46,5 \pm 0,53$ U/mL). Entretanto, a produção de proteases foi bastante baixa nos meios contendo caseína e caldo Sabouraud (CS), meio com PS e meio somente com caseína (C). Para todas as combinações, o pH final do meio era ácido com valores entre 2,4 e 5,7.

Existem diversos estudos descrevendo a peptona como substrato ideal para a produção de protease por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, bem como para outros fungos (PATEL, DODIA e SINGH, 2005; RAO *et al.*, 2006; CHI *et al.*, 2007; HAJJI *et al.*, 2008; FAKHFAKH-ZOUARI *et al.*, 2010; BELMESSIKH *et al.*, 2013; CASTRO e SATO, 2013; RAMAMOORTHY SATHISH KUMAR, ANANTHAN e PRABHU, 2013). Por exemplo, HAJJI *et al.* (2008) observaram a produção de protease por *Aspergillus clavatus* utilizando diferentes fontes de nitrogênio (peptona, caseína, ureia, extrato de levedura, nitrato de sódio e sulfato de amônia), onde a maior produção ocorreu em meio com peptona, extrato de levedura e caseína, enquanto que CASTRO e SATO (2013) relataram que peptona e extrato de levedura foram as melhores fontes de nitrogênio para a produção de protease por *A. oryzae*. Da mesma forma, peptona e extrato de levedura foram um dos melhores substratos para a produção da enzima pelo fungo *Conidiobolus coronatus* (LAXMAN *et al.*, 2005).

Para compreender melhor os efeitos das combinações de carbono e de nitrogênio utilizadas acima na produção de proteases, foram realizadas análises elementares dos substratos, cujos resultados estão resumidos na Tabela 9, em termos de concentração de C (carbono) e N (nitrogênio). De fato, tal como evidenciado por CASTRO e SATO (2013), para alcançar resultados satisfatórios, qualquer substrato deve ter uma proporção de carbono e nitrogênio (C/N) adequada para o processo. Uma vez que a maior produção de protease foi obtida no presente trabalho com peptona, que tem a menor relação C/N entre os componentes

testados, pode-se inferir que, quanto maior o conteúdo de nitrogênio no substrato, maior a atividade da protease ácida. Essa inferência parece ser confirmada pelo fato de que a adição de caldo Sabouraud em todos os meios testados, com a maior relação C/N, piorou a produção de protease. Esse resultado discorda com os relatados por YIN, CHOU e JIANG (2013) para a espécie *A. oryzae*, que produziu principalmente proteases neutras e alcalinas em uma baixa relação C/N e protease ácida em uma alta relação C/N.

Tabela 9. Composição elementar dos componentes do meio utilizados para a produção de protease pelo fungo.^a

Elemento	Peptona (%)	Extrato de levedura (%)	Caseína (%)	Caldo Sabouraud (%)
Carbono	40.16 ± 0.04	39.34 ± 0.02	29.33 ± 0.00	40.2 ± 0.04
Nitrogênio	12.91 ± 0.02	11.47 ± 0.06	8.7 ± 0.01	2.75 ± 0.03
Relação C/N	3.11	3.43	3.37	14.6

^a Valores representam as médias de duplicatas ± desvio padrão.

3.5. Efeito da concentração de peptona na produção de protease

Como o substrato peptona demonstrou ser a melhor fonte de nitrogênio, o seu efeito sobre a produção de proteases pelo fungo *A. foetidus*, foi investigada em diferentes concentrações (0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5 e 3,0% p/v) (Figura 9). Apesar da concentração de biomassa aumentar com a concentração de peptona dentro do intervalo testado, a atividade de protease ocorreu com a concentração de peptona do meio igual a 2,0% (p/v), atingido o seu valor máximo (63,7 ± 3,20 U/mL) e diminuiu com o aumento da concentração. Curiosamente, o pH final do meio atingiu os seus valores máximo (6,4) e mínimo (4,2) apenas sob as condições de menor (26,9 ± 2,83 U/mL) e maior (63,7 ± 3,20 U/mL) atividades de protease, respectivamente, o que parece ser uma nova confirmação da natureza ácida da protease produzida pelo fungo *A. foetidus*.

Figura 9. Efeito da concentração de peptone no crescimento (■), pH final do meio (▲) e atividade de protease (♦) do fungo *A. foetidus*. Condições de cultivo: 28 °C, 150 rpm, 168 h. As diferenças significativas (* $p < 0,05$) foram encontrados por *one way* ANOVA. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

3.6. Cinética de crescimento e produção de protease

A produção de protease ao longo do tempo pelo fungo *A. foetidus* sob a melhor condição de cultivo (peptona a 2% (p/v)) e a condição inicial do meio (peptona 2%, caseína 2%, extrato de levedura 1% e caldo Sabouraud 3% (p/v)) estão apresentados na Figura 10. Em ambos os meios, a produção de protease inicia-se dentro de 48 h de cultivo e atinge valores máximos depois de cerca de 144 - 168 h. Entretanto, no meio contendo somente peptona a produção de protease foi duas vezes maior ($63,7 \pm 3,20$ U / mL) do que a obtida em meio PYCS contendo glicose (Figura 10). Além disso, em meio PYCS, o fungo exibiu uma taxa específica de crescimento máximo ($\mu_{\max} = 0,12$ h⁻¹) e uma produtividade máxima da protease (270 U/Lh) cerca de 50% superior e inferior, respectivamente, do que na presença de apenas peptona. Este comportamento está de acordo com estudos realizados com o fungo *A. niger* (FAVELA-TORRES *et al.*, 1998; VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.*, 2003).

Figura 10. Produção de protease pelo fungo *A. foetidus* em meio contendo peptona, linha (—); e meio PYCS (peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e caldo Sabouraud 3% (p/v), linha (····),

Os resultados da cinética de crescimento do fungo e a produção de protease em meio peptona 2% (p/v), são comparados na Tabela 10 com os resultados obtidos em meio PYCS contendo peptona 2% (p/v), caseína 2% (p/v), extrato de levedura 1% (p/v) e caldo Sabouraud 3% (p/v).

Tabela 10. Principais parâmetros cinéticos e rendimento da produção de protease pelo fungo *A. foetidus*.

Parâmetros	Símbolo	Unidade	Meio de cultivo	
			PYCS ^a	Peptona ^b
Produtividade máxima em biomassa	$P_{X,max}$	$g_X/L.h$	0.59	0.05
Velocidade específica de crescimento	μ_{max}	h^{-1}	0.12	0.08
Produtividade máxima em enzima	$P_{E,max}$	$U/L.h$	270	550
Produtividade específica em enzima	$Y_{E,max}$	$U/g_X.h$	14.9	184.3
Fator de conversão de biomasse em enzima	$Y_{E/X}$	U/g_X	1246	26540

^a PYCS: 2% (p/v) peptona, 2% (p/v) caseína, 1% (p/v) extrato de levedura e 3% (p/v) caldo Sabouraud.

^b 2% (p/v) Peptona.

Além disso, o fator de conversão de biomassa em enzima ($Y_{E/X}$) obtido no meio contendo somente peptona (26.540 U/g biomassa) foi aproximadamente 20 vezes maior que o obtido no meio PYCS. VINIEGRA-GONZÁLEZ *et al.* (2003) também observaram que a adição de glucose no meio de cultivo diminuiu os valores de $Y_{E/X}$ na fermentação submersa da espécie *A. niger*. Estes resultados indicam que a peptona foi provavelmente utilizada pelo fungo não apenas como uma fonte de nitrogênio, mas também como fonte de carbono e energia quando a glicose do meio tornou-se o substrato limitante, e parece ser de alguma importância para a possível produção em larga escala de protease pelo fungo *A. foetidus*.

4. CONCLUSÃO

Este estudo de otimização demonstrou que as melhores condições para a produção de protease ácida pelo fungo filamentoso *A. foetidus* nos parâmetros avaliados, foram pH inicial do meio igual a 7,0, velocidade de agitação de 150 rpm, temperatura de 28 °C, e tempo de fermentação de 168 h. Entre as várias fontes de carbono e nitrogênio testados, peptona 2% (p/v) demonstrou ser o substrato mais adequado para a produção de protease ácida. Este trabalho relatou pela primeira vez, até o nosso conhecimento, a otimização da produção de protease ácida pelo fungo *A. foetidus*, que pode oferecer uma importante contribuição para realizar a produção da enzima em processos de escala industrial.

CAPÍTULO VI

Efeito da aeração e agitação na produção de protease ácida por cultivo submerso do fungo *Aspergillus foetidus* em biorreator

RESUMO

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados para a produção de proteases ácidas extracelulares para aplicações em áreas específicas da indústria. Essas enzimas são utilizados em diferentes processos industriais, tais como o couro e de processamento de alimentos bem como em aplicações farmacêuticas. A produção de protease extracelular por micro-organismos em biorreatores é influenciada por diversos fatores físicos, tais como aeração, agitação, temperatura, densidade do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação. Dessa forma, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da aeração e da velocidade de agitação na produção de protease ácida pelo fungo *Aspergillus foetidus* em biorreator utilizando cultivo submerso. Inicialmente, diferentes taxas de aeração (0,5, 1,0, e 1,5 vvm) foram analisadas, e os melhores resultados foram obtidos a 1,0 vvm. Assim, foram realizados novos experimentos mantendo a taxa de aeração a este valor, variando a velocidade de agitação (100, 200 e 300 rpm). Para a produção de proteases ácidas extracelulares, a melhor condição de velocidade de agitação obtida foi à 300 rpm. Os resultados demonstraram que em baixas velocidades de agitação e aeração o meio tornava-se não homogêneo. Em todos os cultivos, o pH inicial do meio diminuía de aproximadamente 6,5 para um pH ácido entre 4,0 e 5,0 após 120 h de cultivo. Os maiores valores de produtividade ocorreram (0,42 e 0,46 U/h, respectivamente) quando a aeração do meio de cultivo era de 1,0 vvm e as velocidades de agitação de 200 e 300 rpm após 120 h.

Palavras-chave: *Aspergillus foetidus*, protease ácida, cultivo submerso, biorreator.

1. INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são amplamente utilizados em processos biotecnológicos para a produção de metabólitos, substâncias bioativas, como a produção em larga escala de grandes quantidades de enzimas industriais (BOER e PERALTA, 2000). No entanto, existe uma relação complexa entre a morfologia desses micro-organismos, os fenômenos de transporte, a viscosidade do meio de cultivo, bem como a concentração máxima desses produtos e a produtividade do sistema. Em cultivo submerso, a morfologia do fungo pode ocorrer em dois diferentes tipos: micélios filamentosos individuais e colônias esféricas densas, os chamados *pellets*. A forma de *pellet* normalmente é menos viscosa e permite uma homogeneidade do meio, além de uma melhor transferência de massa de oxigênio e nutrientes para o meio de cultura, pois os *pellets* se comportam como esferas discretas e exercem pouca influência nas propriedades de fluxo do meio (SARASWATHY e HALLBERG, 2005). Além disso, a separação dos *pellets* a partir do meio se torna mais simples nos processos *downstream* (EL-ENSHASY, 2007).

Os micélios tornam o meio de cultivo altamente viscoso, o que reduz a a velocidade de transferência de massa gás-líquido e a homogeneidade no biorreator. O oxigênio limitado devido a fraca homogeneidade do meio pode resultar numa supressão ou até total inibição na produção de metabólitos pelos fungos (GIBBS, SEVIOUR e SCHMID, 2000). O aumento da viscosidade do meio de cultivo leva à heterogeneidade, fases estacionárias, formações de regiões não mistas, o que torna o cultivo desafiador e mais caro para operar (ONCU, TARI e UNLUTURK, 2007).

As variações nas características do meio afetam as propriedades hidrodinâmicas do biorreator, que incluem a homogeneidade e a transferência de massa (KILONZO e MARGARITIS, 2004; PETERSEN *et al.*, 2008). Assim, a eficiência e a produtividade de todo o processo dependem destas propriedades hidrodinâmicas. Dessa forma, a combinação das condições de operação, tais como a intensidade de agitação, a taxa de aeração, a espécie do micro-organismo, a composição do meio e a hidrodinâmica no biorreator, influenciam a morfologia celular, o fornecimento de nutrientes e oxigênio e a homogeneidade do meio, que por sua vez, determinam o desempenho do processo (ONCU, TARI e UNLUTURK,

2007). Os sistemas de cultivo submerso de fungos filamentosos mostram geralmente características reológicas não-Newtonianas (OLSVIK e KRISTIANSEN, 1994).

A produção de proteases extracelulares por micro-organismos em biorreatores é muito influenciada por componentes de meio e fatores físicos, tais como aeração, agitação, temperatura, densidade do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (ÇELIK e ÇALIK, 2004). Além disso, o desenho racional e a otimização do biorreator requer o conhecimento da cinética de produção dessas enzimas (JOO *et al.*, 2002). A homogeneidade é um importante fator na síntese de proteases microbianas em biorreator, além de ser largamente favorecida por uma maior transferência de massa de oxigênio e por forças de cisalhamento mais baixas. Portanto, é necessário estabelecer a melhor combinação de fluxo de ar (aeração) e agitação para conseguir o rendimento máximo da produção da enzima.

Desse modo, o presente estudo tem por objetivo avaliar a influência da aeração e da velocidade de agitação na produção de protease ácida pelo fungo *Aspergillus foetidus* em biorreator utilizando cultivo submerso.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

A cepa de *Aspergillus foetidus* foi identificada fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esta cepa foi isolada do cerrado da região do centro-oeste brasileiro e encontra-se depositada na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

2.2. Produção de protease ácida por cultivo submerso em biorreator

Os experimentos foram realizados em biorreator de 5 L Bioflo® 110 (New Brunswick) contendo 3 L de meio de cultivo peptona 2% (p/v). O biorreator foi equipado com turbinas do tipo *Rushton* e chicanas. A dorna contendo meio foi esterilizada a 121 °C por 20 minutos. Os experimentos foram conduzidos durante 120 horas a 30 °C, sendo que a cada 24 horas era retirada uma alíquota. A partir de cada amostra retirada determinou-se a produção de protease ácida, pH e proteínas totais no meio. A peptona na concentração de 2% (p/v) foi escolhida como substrato único no biorreator considerando os resultados prévios obtidos nos cultivos em frascos agitados.

Inicialmente, as condições analisadas foram: velocidade de agitação de 200 rpm e aeração de 0,5, 1 e 1,5 vvm. A segunda parte do trabalho foi realizada mantendo a aeração em 1vvm nas velocidades de agitação de 100 e 300 rpm. Em todas as condições, o cultivo submerso foi encerrado com 120 horas de cultivo, pois após este tempo o micélio fungico já não se encontrava distribuído de forma homogênea no biorreator. Como discutido anteriormente, esta é uma dificuldade que se encontra quando se trabalhar com fungos filamentosos em biorreator, pois o meio disperso de fungos filamentosos apresenta geralmente viscosidade alta.

2.3. Determinação da atividade de protease

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 500 µL do filtrado a 37°C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

2.4. Produtividade

A partir dos dados obtidos foi determinada a produtividade de acordo com a seguinte equação:

$$P = \frac{\Delta U}{t} \quad (1)$$

onde, U é a atividade enzimática e t é o tempo em horas (h).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, as diferentes condições de aeração foram analisadas, com velocidade de agitação fixada em 200 rpm. A Figura 11 apresenta a produção de protease ácida em função do tempo sob as diferentes condições de aeração. Em todos os cultivos, a produção de protease foi aumentando ao longo do tempo atingindo um nível máximo após 120 h. A maior produção de protease ocorreu quando a aeração do meio foi de 1,0 vvm (50,9 u/mL). Como pode-se observar, a produção da protease ácida foi influenciada pela aeração do meio, como em estudos feitos em biorreatores do tipo STR, que também mostrara que a espécie *A. oryzae* possui a melhor produção de proteases a uma taxa de aeração igual a 1,0 vvm (WANG, LAW e WEBB, 2005). Rao et al. (2006), também analisaram diferentes taxas de aeração na produção de proteases pela espécie de fungo filamentoso *Beauveria bassiana*, quando cultivada em biorreator do tipo STR, sendo a melhor produção sob aeração de 0,6 vvm (RAO et al., 2006).

Figure 11. Produção de proteases pelo fungo *A. foetidus* por cultivo submerso em biorreator variando a aeração do meio em função do tempo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A influência da velocidade de agitação do meio líquido na produção de protease também foi investigada em biorreator. Nos experimentos realizados variando a aeração do meio, a maior produção de proteases foi obtida ao se trabalhar com 1,0 vvm. Desta maneira, esse valor de aeração foi fixado para serem avaliadas diferentes velocidades de agitação do meio. A partir da Figura 12 pode-se observar que a produção de proteases foi fortemente influenciada pela velocidade de agitação do meio de cultivo. A melhor velocidade de agitação para a produção de protease pelo fungo foi igual a 300 rpm (55,75 U/mL). No menor valor avaliado (100 rpm), o micro-organismo não se distribui de forma homogênea no biorreator, quando comparado aos outros valores de agitação (200 e 300 rpm), pois em velocidades baixas de agitação ocorrem maiores amontoados do fungo em algumas partes da dorna do biorreator. A intensidade da velocidade de agitação pode afetar tanto a morfologia do fungo como a transferência de nutrientes e oxigênio no biorreator. Em muitos cultivos com fungos filamentosos, uma alta velocidade de agitação é necessária para fornecer adequada homogeneidade e transferência de massa, especialmente quando o fungo cresce disperso no meio o que resulta em uma alta viscosidade e um cultivo. Entretanto, esses valores altos de velocidade de agitação

deveriam ser evitados a fim de prevenir elevadas forças de cisalhamento na estrutura do micélio, podendo causar autólise e diminuição na produtividade do metabólito (WANG *et al.*, 2005; RAO *et al.*, 2006).

Figura 12. Produção de proteases pelo fungo *A. foetidus* por cultivo submerso em biorreator variando a velocidade de agitação do meio em função do tempo. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Em relação à variável pH, independente da condição de aeração e agitação, houve diminuição no valor do pH do meio ao longo do tempo de cultivo. Esse comportamento também foi observado nos cultivos submersos do fungo em *shaker*. O pH inicial do meio próximo de 6,5 é adequado para proporcionar bom crescimento do micro-organismo, e os valores máximos de produção de protease ocorreram após 120 horas de cultivo quando o pH do meio era ácido. JARAI e BUXTON (1994) demonstraram que o pH do meio desempenha um importante papel na regulação da produção de proteases ácidas extracelulares pelo fungo *A. niger*, em que a expressão de genes foi completamente inibida em condições alcalinas do meio, mesmo quando o fungo crescia em boas condições de fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, a diminuição do pH durante a produção de proteases pode estar diretamente relacionada com o consumo do substrato peptona pelo fungo *A. foetidus* devido à formação de ácidos orgânicos.

Em diferentes condições de aeração (Figura 13), os valores do pH final do meio estavam entre 4,7 e 5,7 após 120 horas, sendo a maior produção de protease nas condições com 200 rpm e 1,0 vvm. Porém, quando diferentes velocidades de

agitação foram avaliadas (Figura 14), pode-se observar que a 300 rpm, o pH final do meio atingiu seu menor valor, diminuindo para 3,7 após 120 horas de cultivo, e a produção de enzima foi máxima com valor igual a 55,75 U/mL.

Figura 13. Valores do pH do meio ao longo do tempo no cultivo submerso do fungo *A. foetidus* em biorreator variando a aeração do meio. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

Figura 14. Valores do pH do meio ao longo do tempo no cultivo submerso do fungo *A. foetidus* em biorreator variando a velocidade de agitação do meio. As barras de erro correspondem a um intervalo de confiança de 95% nos valores obtidos.

A Tabela 11 apresenta os resultados de produtividade em todas as condições experimentais após 96 e 120 horas de cultivo. Analisando os resultados, os maiores valores de produtividade ocorreram quando a aeração do meio de cultivo era de 1,0 vvm e as velocidades de agitação de 200 e 300 rpm (0,42 e 0,46 U/h,

respectivamente) após 120 horas. A queda dos valores de produtividade quando a aeração do meio era de 1,5 vvm pode está relacionada à maior força cisalhamento e, conseqüentemente à morfologia do fungo. Quando a agitação do meio diminuiu para 100 rpm, a produtividade também teve valores baixos, o que pode estar relacionado com uma menor transferência de oxigênio. Estes resultados demonstram a importância deste parâmetro em cultivos submersos realizados em biorreator, pois ele está diretamente relacionado à morfologia do micro-organismo, no interior da dorna, e à transferência de massa durante o processo.

Tabela 11. Produtividade obtida pelo cultivo submerso do fungo *A. foetidus* em biorreator para a produção de proteases.

Aeração do meio (vvm)	Agitação (rpm)	Produtividade (U/h)	
		96 h	120 h
0,5	200	0,34 ± 0,00	0,33 ± 0,01
1,0	200	0,40 ± 0,03	0,42 ± 0,01
1,5	200	0,10 ± 0,00	0,15 ± 0,00
1,0	100	0,04 ± 0,00	0,16 ± 0,01
1,0	300	0,36 ± 0,02	0,46 ± 0,00

As análises de todos os parâmetros no cultivo de fungos filamentosos em biorreatores possui diversos obstáculos e dificuldades. Neste estudo, em todas as condições de cultivo analisadas, ocorreram grandes aglomerados de biomassa na forma de micélio entre as chicanas e na parede da dorna do biorreator, tornando o meio líquido viscoso. Esse comportamento reológico não-Newtoniano conduz a viscosidade muito baixa em regiões de alto cisalhamento (regiões próximas ao rotor) e a viscosidade muito alta nas regiões de baixo cisalhamento (parede e chicanas do biorreator) (MCINTYRE *et al.*, 2001). Além da heterogeneidade do meio e da baixa transferência de massa, somente uma pequena parte do biorreator próxima ao rotor é mantida em condições ótimas de cultivo, afetando a produção da enzima. Além disso, o outro parâmetro que não pôde ser analisado foi o nível de oxigênio dissolvido no meio, pois a sonda estava totalmente coberta por uma massa de micélio impedindo sua detecção.

Apesar das dificuldades em termos da viscosidade do meio durante o cultivo submerso do fungo *A. foetidus* em biorreator do tipo STR, existe a possibilidade de

outros estudos serem realizados em diferentes tipos de biorreatores, como por exemplo, biorreatores do tipo *air lift*, comparando-se a produção de proteases deste com aquele obtido em biorreator agitado mecanicamente (STR). Na literatura podem-se encontrar diversos estudos que mostram cultivos de fungos filamentosos em biorreatores do tipo *air lift*, onde os fungos cresceram na forma de *pellets*, diminuindo a viscosidade do meio e consequentemente mantendo a homogeneidade do processo (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000).

3.1 Determinação do Valor do k_La

O sistema de agitação e aeração é muito importante quando precisamos otimizar o fornecimento de oxigênio necessário para a atividade respiratória do micro-organismo, ou seja, garantir a transferência do oxigênio da fase gasosa para o líquido e a sua dissolução homogênea no meio de cultivo, para que cada célula microbiana possa assimilá-lo e utilizá-lo na respiração. Sendo assim, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi estimado com base no método polarográfico (WISE, 1951), que estima o valor do k_La baseado na velocidade de dissolução do oxigênio em um meio definido, em função das condições de aeração e agitação. Para estas determinações utilizou-se um medidor de oxigênio dissolvido (NBS DO-81) acoplado a uma sonda de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo®) tipo célula polarográfica. Esta sonda de oxigênio dissolvido foi anteriormente calibrada e as medidas foram realizadas com o fermentador contendo água em substituição ao meio de cultura, na temperatura de 30°C, em diferentes condições de agitação e aeração.

O fermentador foi rapidamente regulado para condições definidas de agitação e aeração, e então foi monitorada a medida do aumento da concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo. De acordo com PIRT (1975), o balanço de massa na fase líquida é dado pela seguinte expressão: $dC/dt = k_La \cdot (C_s - C)$, com C_s igual à concentração de oxigênio dissolvido na saturação (100%). Integrando-se a referida equação e traçando-se a curva $\ln(C_s - C)$ em função do tempo, determina-se a inclinação da reta obtida, correspondente ao valor de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($-k_La$).

Os valores de k_{La} obtidos em diferentes condições de agitação e aeração, bem como exemplos de cálculos das condições estabelecidas para o cultivo, estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Valores de k_{La} em função das condições de agitação e aeração obtidas em água no fermentador New Brunswick.

Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	k_{La} (h^{-1})
0,5	200	11,16
1,0	100	16,20
1,0	200	17,64
1,0	300	18,72
1,5	200	11,52

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliou-se a influência da aeração e da velocidade de agitação na produção de proteases ácidas extracelulares pelo fungo *A. foetidus* em biorreator agitado. Os valores máximos de produção da enzima ocorreram nas condições de agitação e aeração iguais a 300 rpm e 1,0 vvm, respectivamente. Estes resultados demonstram a grande influência da velocidade de agitação e aeração sobre a produção de protease, apesar das dificuldades durante o cultivo submerso do fungo filamentoso em biorreator.

CAPÍTULO IV

Caracterização e estudos cinéticos e termodinâmicos da protease ácida produzida pelo fungo *Aspergillus foetidus*

RESUMO

A cinética de uma protease ácida extracelular termoestável produzida por uma cepa do fungo *Aspergillus foetidus* isolado do cerrado brasileiro foi investigada em diferentes pH, temperaturas e concentrações de substrato (azocaseína). A enzima exibiu uma atividade máxima em pH 5,0 e temperatura de 55°C, e a sua desativação irreversível foi também descrita por uma cinética de primeira ordem. Quando a temperatura foi aumentada de 55 para 70°C, a constante de velocidade de desativação aumentou de 0,018 para 5,06 h⁻¹, enquanto que a meia-vida diminuiu correspondentemente de 37,6 para 0,13 h. Os resultados da atividade inicial obtidos a diferentes temperaturas ($30 \leq T \leq 75$ °C) foram então utilizados para calcular, por meio do gráficos de Arrhenius, a energia de ativação da reação de hidrólise ($E^* = 19,03$ kJ/mol) e a variação de entalpia padrão do desdobramento reversível da enzima ($\Delta H^\circ_U = 90,35$ kJ/mol). Da mesma forma, os resultados dos testes de atividade residual realizados entre as temperaturas de 55 - 70 °C permitiram estimar a energia de ativação ($E^*_d = 314,12$ kJ/mol), entalpia ($311,27 \leq \Delta H^*_d \leq 311,39$ kJ/mol), entropia ($599,59 \leq \Delta S^*_d \leq 610,49$ kJ/mol K) e energia livre de Gibbs ($103,18 \leq \Delta G^*_d \leq 113,87$ kJ/mol) da desnaturação irreversível da enzima. Estes parâmetros termodinâmicos tomados em conjunto sugerem que a nova protease ácida investigada neste estudo é altamente termoestável e pode ser de alguma importância para aplicações industriais. Para o melhor de nosso conhecimento, este é o primeiro relato sobre os parâmetros termodinâmicos de uma protease ácida produzida pelo fungo *A. foetidus* isolado do cerrado brasileiro.

Palavras-chave: protease ácida; *Aspergillus foetidus*; termoestabilidade.

1. INTRODUÇÃO

Proteases microbianas (EC 3.4) estão entre as enzimas hidrolíticas mais importantes, o que representa um dos maiores grupos de enzimas industriais e correspondem por aproximadamente 60% do total do mercado de enzimas no mundo (ZAMBARE, NILEGAONKAR e KANEKAR, 2011). A grande especificidade da ação hidrolítica das proteases encontra inúmeras aplicações em diferentes indústrias como a de alimentos, detergentes para a roupa, couro, produtos farmacêuticos e de seda, para recuperação de prata do filmes exaustos de raios-X e para a digestão de resíduos, bem como na elucidação estrutural de proteínas, ao passo que a sua ação é explorada na síntese de proteínas (RAO *et al.*, 1998; JOHNVESLY e NAIK, 2001; GUPTA, BEG e LORENZ, 2002; ABIDI *et al.*, 2011).

Os fungos são bastante utilizados na prática industrial por causa da sua capacidade de produzir enzimas extracelulares em elevada concentração; por outro lado, oferecem a vantagem adicional sobre as bactérias de fazer o processamento *downstream* mais fácil (HAJJI *et al.*, 2010). Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir uma variedade de proteases extracelulares, alguns dos quais sendo utilizado como modelos para estudos de estabilidade térmica (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Estudos termodinâmicos e cinéticos podem fornecer informações valiosas sobre a estabilidade térmica de enzimas na temperatura de operação do processo. Acredita-se que a enzima sofre uma reação de desativação de primeira ordem, que é responsável pela sua desnaturação irreversível, cuja cinética é geralmente expressa em termos de tempo de meia-vida da enzima ($t_{1/2}$) (MARANGONI, 2003). Por outro lado, a energia de ativação e as mudanças na energia livre de Gibbs, entalpia e entropia entre os estados dobrado e desdobrado da enzima são os parâmetros mais frequentemente encontrados na literatura que descrevem a desnaturação termodinâmica (SAQIB *et al.*, 2010).

A atividade e estabilidade térmica de enzimas são questões importantes que devem ser levadas em conta para avaliar a viabilidade econômica de processos industriais baseados em enzimas. Alta estabilidade é geralmente considerada uma vantagem econômica por causa da redução do consumo de enzima; portanto, antes de prosseguir para desenvolver formulações de enzimas, é necessário acumular

informações sobre a estabilidade da enzima em diferentes condições (VIEILLE e ZEIKUS, 2001; GOHEL e SINGH, 2012). Um certo número de relatórios sobre as proteases fúngicas e estáveis ao calor são encontrados na literatura; no entanto, as propriedades termodinâmicas de proteases são pouco descritas, especialmente no caso de proteases ácidas.

Com base neste contexto, o objetivo do presente trabalho é a determinação de parâmetros cinéticos e termodinâmicos da atividade e estabilidade térmica de uma protease ácida extracelular produzida por uma nova cepa do fungo *Aspergillus foetidus* isolado do cerrado brasileiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e condições de cultivo

A cepa de *Aspergillus foetidus* foi identificada fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esta cepa foi isolada do cerrado da região do centro-oeste brasileiro e encontra-se depositada na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

Como foi sugerido no estudo de otimização anterior, culturas submersas foram realizadas durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm, utilizando peptona 2% (p/v) como substrato. Para esta finalidade, discos de micélio (4 mm) obtidos do pré-cultivo em placa de Petri de 7 dias contendo PDA foram utilizados como inóculo. O meio de cultura e os micélios foram filtrados sob vácuo através de papel de filtro Whatman nº 1 em funil de Buchner. O sobrenadante foi liofilizado e o extrato enzimático foi utilizada para realizar os testes do estudo termodinâmico.

2.2 Determinação da atividade de protease

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 500 μ L do filtrado a 37°C, na presença de 500 μ L de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 μ L de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

Para investigar o efeito do pH (5,0 - 9,0) na atividade de protease, a solução de azocaseína 0,5% (p/v) dissolvida, de acordo com o pH selecionado, em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0), fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,0 - 8,0), ou carbonato de sódio 0,2 M (pH 9,0). Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ DP (Desvio Padrão).

2.3 Determinação dos parâmetros cinéticos

A constante de Michaelis (K_m) e a velocidade máxima (v_{max}) da reação catalisada pela enzima foram determinadas através de gráfico duplo recíproco (Lineweaver–Burk) da atividade de protease versus a concentração de azocaseína (1,25 – 15,0 g/L) em pH 5.0.

2.4 Estudo termodinâmico

Como descrito por CONVERTI *et al.* (2002), o fenômeno geral de inativação térmica da enzima pode ser descrito por um equilíbrio do desdobramento da enzima (constante de equilíbrio K_U) seguido por um passo irreversível que conduz à sua desnaturação (constante de primeira ordem k_d). À temperatura (T) menor do que a ótima (T_{opt}), o equilíbrio é deslocado para cima na direção do lado esquerdo, a inativação da enzima é desprezível, e a taxa específica inicial de hidrólise de proteínas (k_0) pode ser descrita pela equação de Arrhenius. Por outro lado, quando a $T > T_{opt}$, o equilíbrio é deslocado para o lado direito (ROELS, 1983); assim, substituindo a definição de K_U no balanço de massa da enzima e aplicando as equações de Gibbs e de Michaelis-Menten, obtemos:

$$k_0 = \frac{A \exp(-E^* / RT)}{1 + B \exp(-\Delta H_U^o / RT)} \quad (1)$$

onde E^* é a energia de ativação da reação catalisada pela protease, R a constante universal dos gases, A o fator pré-exponencial de Arrhenius, ΔH_U^o a variação de entalpia padrão da inativação do equilíbrio e B um fator pré-exponencial adicional.

Sob estas condições, a contribuição da forma desdobrada da enzima torna-se predominante devido ao aumento de K_U com a temperatura, dessa forma a Eq. (1) simplifica a:

$$k_0 = \frac{A}{B} \exp\left(\frac{(\Delta H_U^o - E^*)}{RT}\right) \quad (2)$$

Apesar da impossibilidade de se obter, para um novo sistema de enzima assim investigadas neste estudo, os vales reais de k_0 , exploramos a proporcionalidade existente entre um tal parâmetro e da atividade da enzima inicial (v_0). Portanto, E^* para a reação catalisada pela protease e ΔH_U^o para seu desdobramento reversível foram estimados a partir das inclinações das retas que

descrevem, de acordo com a equação de Arrhenius e Eq. (2), respectivamente, a dependência de $\ln v_0$ em $1/T$.

Por outro lado, o processo de inativação térmica irreversível (desnaturação) pode ser cineticamente descrito por cinética de primeira ordem:

$$v_d = k_d E \quad (3)$$

onde v_d é a taxa de inativação da enzima e E a concentração de sua forma ativa.

Definindo o coeficiente de atividade como a relação de E para a concentração de enzima no início do tratamento térmico ($\psi = E/E_0$), k_d foi estimado em diferentes temperaturas a partir das inclinações das retas obtidas traçando os dados experimentais de $\ln \psi$ vs tempo. Finalmente, plotando de acordo com Arrhenius $\ln k_d$ vs $1/T$, estimamos a partir da inclinação da reta resultante da energia de ativação da inativação irreversível da enzima (desnaturação) (E_d^*). Os outros parâmetros da desnaturação da protease foram estimados de acordo com MELIKOGLU, LIN e WEBB (2013), pelas equações:

$$\Delta H_d^* = E_d^* - RT \quad (4)$$

$$\Delta G_d^* = -RT \ln \left[\frac{k_d h}{k_B T} \right] \quad (5)$$

$$\Delta S_d^* = \frac{\Delta H_d^* - \Delta G_d^*}{T} \quad (6)$$

sendo ΔH_d^* , ΔG_d^* e ΔS_d^* a variação da entalpia, energia livre de Gibbs e entropia entre as formas desnaturada e ativa da enzima, respectivamente, enquanto que k_B e h são as constantes de Boltzmann e Planck, respectivamente.

A meia-vida da enzima ($t_{1/2}$) foi definida como o tempo após o qual E foi reduzida para a metade do valor inicial e, em seguida, calculado como $t_{1/2} = \ln 2/k_d$ (MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para selecionar o pH ótimo para a atividade da protease produzida pelo fungo *Aspergillus foetidus*, testes foram realizados a temperatura (T) de 37°C na faixa de pH inicial (pH₀) de 5,0 – 10,0, utilizando azocaseína na concentração inicial (S_0) de 5 g/L (Figura 15). Protease demonstrou uma atividade satisfatória entre pH 5,0 e 7,0, com atividade ótima em pH 5,0 (55.65 U/mL). Diferentes valores de pH₀ são relatados para atividade ótima de proteases produzida pelos fungos *Aspergillus tamari* (pH 6,0 a 9,5) (BOER e PERALTA, 2000) e *Aspergillus awamori* (pH 4,0 e 5,0) (NEGI e BANERJEE, 2009). Baseado nesses resultados as próximas etapas do estudo foram realizadas em pH₀ = 5,0.

Figura 15. Efeito do pH na atividade da protease ácida extracelular produzida pelo fungo *A. foetidus*. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

Para estimar os parâmetros cinéticos K_m and v_{max} , testes adicionais foram realizados a 37°C e pH₀ 5.0 variando S_0 de 1.25 a 15 g/L. Traçando os resultados de acordo com Lineweaver-Burk (Figura 16), a enzima foi mostrada a seguir, com boa correlação ($R^2 = 0.994$), cinética do tipo Michaelis-Menten com $K_m = 1,92$ mg/mL (0,8 mM) e $v_{max} = 357,14$ U/mL. É difícil comparar estes resultados com os relatados na literatura, porque a atividade de qualquer enzima é bem conhecida depende do

tipo de substrato utilizado. No entanto, embora o valor acima de K_m ser mais elevado do que os relatados para a serina protease do fungo *A. niger* (0,44 mg/mL) (DE CASTRO, NISHIDE e SATO, 2014) e para a protease ácida de *A. awamori* (1,08 mg/mL) (NEGI e BANERJEE, 2009) utilizando azocaseína como substrato, o valor de v_{max} é muito maior (126,5 U/mL e 8,8 U/mL, respectivamente), indicando assim uma melhor cinética.

Figura 16. Gráfico de duplo recíproco (Lineweaver-Burk) da taxa inicial de hidrólise da azocaseína pela protease ácido do fungo *A. foetidus* versus a concentração de azocaseína. As barras de erro representam 95% dos limites de confiança para as medições.

A temperatura ótima da enzima foi identificada através da realização de testes de atividade a pH_0 5,0, $S_0 = 100$ mg/L e variando T de 30 para 75 °C. Para minimizar a influência da perda de atividade devido a desnaturação irreversível da protease, só os valores iniciais de atividade da enzima (v_0) foram considerados. A protease mostrou-se ativa ao longo de um intervalo de T (30-65°C) com valor ótimo de atividade a 55°C (Figure 17).

Figura 17. Efeito da temperatura na atividade da protease ácida extracelular produzida pelo fungo *A. foetidus*.

O gráfico do semi-log de $\ln v_0$ vs $1/T$ mostrou um aumento linear abaixo de 55 °C, enquanto que uma tendência oposta foi observada sobre esse valor limite (Figura 18). Tal temperatura ideal é consistente com o relatado por outros pesquisadores para proteases extracelulares de outras espécies de *Aspergillus*, como o *A. fumigatus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013).

Figura 18. Gráfico de Arrhenius da atividade inicial da protease ácida produzida pelo fungo *A. foetidus* utilizando azocaseína como substrato.

A partir das inclinações das linhas das retas da Figure 18, uma energia de ativação da reação de hidrólise (E^*) de 19,03 kJ/mol e uma variação de entalpia padrão do desdobramento da enzima (ΔH°_U) de 90,35 kJ/mol foram estimados com correlação satisfatória ($R^2 = 0,908$ e $0,988$, respectivamente). A energia de ativação é substancialmente menor do que as das enzimas semelhantes; por exemplo, valores de E^* de 62, 36,8 e 31,97 kJ/mol foram relatados por uma serina-protease neutra do fungo *A. fumigatus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013) e uma protease alcalina de *Nacordiopsis alba* (GOHEL e SINGH, 2012), respectivamente. O valor muito baixo de E^* estimado para a protease sob investigação indica que é necessário um pouco de energia, para formar o complexo ativado de hidrólise de azocaseína, destacando assim uma capacidade hidrolítica especialmente eficaz. Por fim, a comparação acima como um todo sugere também que a sua natureza ácida pode ter desempenhado um papel importante de ambos os pontos de vista.

Na medida em que a estabilidade térmica da protease é considerada, testes de atividade residual a longo do tempo foram realizados a temperaturas entre 55 - 70 °C utilizando a maior E_0 (50 U/mL) para acelerar a reação, cujos resultados em termos do coeficiente de atividade residual (ψ) estão ilustrados na Figura 19. A atividade de protease seguida do decaimento clássico do padrão da desnaturação de primeira ordem já foi observado para outros fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus* (TELLO-SOLIS e HERNANDEZ-ARANA, 1995; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011; MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013).

Figura 19. Semi-log da desnaturação irreversível da protease ácida produzida pelo fungo *A. foetidus*. T (°C): 55 (●); 60 (■); 65 (▲); 67 (x); 70 (◆). pH₀ 5.0; atividade inicial de protease = 50 U/mL; concentração inicial de substrato = 1 mM azocasein.

Como é bem conhecido, o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), que é o tempo requerido para a atividade enzimática cair para 50% do valor de partida a uma dada temperatura, é um parâmetro de grande importância econômica em muitas aplicações industriais, porque quanto maior o seu valor, maior será a estabilidade térmica da enzima. Os resultados destes testes cinéticos resumidos na Tabela 13 mostram que o $t_{1/2}$ diminuiu progressivamente e a taxa específica de inativação térmica de primeira ordem da protease (k_d) aumentou progressivamente com a temperatura, o que significa que a sua desnaturação irreversível tornou-se cada vez mais significativa. O valor de k_d obtido a 55 °C ($0,018 \text{ h}^{-1}$) foi significativamente menor, e o valor de $t_{1/2}$ (37,64 h) maior, do que aqueles relatados para proteases das espécies *A. awamori* ($k_d = 0,04 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 17,1 \text{ h}$; $T = 55^\circ\text{C}$) (MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013) e *A. fumigatus* ($k_d = 0,026 \text{ h}^{-1}$; $t_{1/2} = 1,08 \text{ h}$; $T = 50^\circ\text{C}$) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011). Assim, a protease ácida produzida no presente estudo parece ser mais termoestável, pelo menos, do que algumas das enzimas semelhantes reportados na literatura.

Tabela 13. Parâmetros termodinâmicos e cinéticos da desativação (desnaturação) térmica irreversível da protease ácida produzida pelo fungo *A. foetidus*.

$T (^{\circ}\text{C})$	$k_d (\text{h}^{-1})$	$t_{1/2} (\text{h})$	$\Delta H_d^* (\text{kJ/mol})$	$\Delta G_d^* (\text{kJ/mol})$	$\Delta S_d^* (\text{J/mol K})$
55	0.018	37.6	311.39	113.87	601.92
60	0.261	2.65	311.35	107.96	610.49
65	0.608	1.14	311.31	107.59	602.45
67	0.836	0.82	311.29	107.34	599.59
70	5.06	0.13	311.27	103.18	606.41

O gráfico do semi-log de $\ln k_d$ vs $1/T$ possibilitou estimar uma energia de ativação de desnaturação da protease (E_d^*) igual a 314,12 kJ/mol ($R^2 = 0,946$). Este valor é uma ordem de grandeza superior aos relatados por proteases alcalinas dos produzidas por *A. fumigatus* (69 kJ/mol) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011), *Nocardiosis alba* (74,8 kJ/mol) (GOHEL e SINGH, 2012) e *Bacillus licheniformis* (32,8 - 48,5 kJ/mol dependendo do pH) (BHUNIA *et al.*, 2013), proporcionando mais uma prova da excelente estabilidade térmica da protease do fungo *A. foetidus*, provavelmente associada à sua natureza ácida. Também pode se perceber a partir desta comparação que existe uma variabilidade muito grande dos dados E_d^* na literatura, provavelmente devido às grandes diferenças na fonte e pureza das enzimas, assim como nos substratos utilizados.

A E_d^* está diretamente relacionada, através da Equação (4), com a entalpia de ativação de desnaturação (ΔH_d^*), que é um outro parâmetro termodinâmico importante que expressa a quantidade total de energia necessária para desnaturar a enzima; Portanto, os valores grandes e positivos de E_d^* e ΔH_d^* deve ser associado com a alta estabilidade térmica da enzima (MARANGONI, 2003; SAQIB *et al.*, 2010). A protease ácida investigada aqui tem um valor de ΔH_d^* a 55°C (311.39 kJ/mol) (Tabela 13) muito mais elevado do que aqueles relatados para as proteases neutras ou alcalinas acima dos fungos *A. awamori* (MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013), *A. fumigatus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011) e *N. alba* (GOHEL e SINGH, 2012), o que confirma as conclusões anteriores.

A extensão da desnaturação térmica da enzima, também depende da entropia de ativação (ΔS_d^*) do presente evento, que expressa a quantidade de energia por grau envolvida na transição de um estado nativo para um desnaturado (MARANGONI, 2003). Como mostrado na Tabela 13, de forma consistente com o

aumento no grau de desordem ou aleatoriedade consequentes de uma transição deste tipo, os valores de ΔS_d^* foram positivos (599,59 - 610,49 J/mol K) em todas as temperaturas nas quais a protease do fungo *A. foetidus* foi testada. Além disso, esses valores foram superiores aos relatados para as proteases das espécies *A. awamori* ($-93,5 \leq \Delta S_d^* \leq 126,5$ J/mol K) (MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013), *N. alba* ($\Delta S_d^* = -69,99$ J/mol K) (GOHEL e SINGH, 2012) e *A. fumigatus* ($-69,5 \leq \Delta S_d^* \leq -68,2$ J/mol K) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

Outro parâmetro termodinâmico importante, a energia livre de Gibbs de desnaturação (ΔG_d^*), inclui tanto contribuições de entalpia e entropias; portanto, é uma ferramenta de predição mais precisa e fiável para avaliar a estabilidade da enzima. Um valor menor ou negativo de um tal parâmetro é associado com um processo mais espontânea, isto é, a enzima torna-se menos estável e sofre mais facilmente desnaturação (MARANGONI, 2003). Ao contrário, um aumento na ΔG_d^* revela um aumento na resistência à desnaturação, ou seja, um aumento da termoestabilidade (GOHEL e SINGH, 2012). De forma consistente com a estabilidade térmica discutida acima, a ΔG_d^* para a protease ácida do fungo *A. foetidus* foi bastante elevada, atingindo 113,8, 107,9, 107,5, 107,3 e 103,1 kJ/mol a 55, 60, 65, 67 e 70°C, respectivamente (Tabela 11). Esses valores são comparáveis aos encontrados na literatura para as proteases dos fungos *A. awamori* (111,7 kJ/mol) (MELIKOGLU, LIN e WEBB, 2013) e *A. fumigatus* (103,07 kJ/mol) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2011).

4. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo a determinação das propriedades cinéticas e termodinâmicas da protease ácida extracelular produzida pelo fungo *A. foetidus*, que, tanto quanto é do nosso conhecimento, não foi feito até à data. Observou-se uma atividade máxima a pH 5,0 e 55 °C. Testes de atividade residual realizados a temperatura entre 10 e 70 °C permitiu estimar o tempo de meia-vida muito longo da enzima ($t_{1/2} = 37,74$ h a 55°C), bem como os parâmetros termodinâmicos de desnaturação irreversível da enzima. Tal evento foi caracterizada por uma energia de ativação, energia livre de Gibbs e entalpia tão alto de 314,12, 111,7 e 311 kJ/mol e uma entropia ativação de 601,9 J/mol.K. Estes valores destacam toda a excelente estabilidade térmica da enzima que poderia ser explorada de forma rentável para futuras aplicações industriais, especialmente nos setores das indústrias de cosméticos e farmacêutica.

CAPÍTULO V

Purificação e caracterização parcial de uma protease ácida produzida pelo fungo *Aspergillus foetidus*

RESUMO

Proteases aspárticas consistem em uma subfamília de endopeptidases que são úteis numa variedade de aplicações, especialmente na indústria farmacêutica e cosmética. Este trabalho descreve um protease aspártica purificada do fungo filamentoso *Aspergillus foetidus* isolado do cerrado brasileiro. A protease aspártica foi purificado até à homogeneidade através da coluna de cromatografia Sephacryl S-200, o que resultou em um aumento de 16,8 vezes de atividade específica (248,1 U/g) e 101,7% de recuperação. O peso molecular estimado da enzima purificada era 50,6 kDa. A atividade da enzima não foi significativamente inibida por fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), iodoacetamida e por quelação com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e a adição de íons metálicos não alterou de forma significativa a atividade da enzima, o que indica que a proteólise é metal não dependente. A enzima foi completamente inativada pelo inibidor pepstatina A e a atividade foi aumentou na presença dos íons de zinco, magnésio, ferro e prata. De acordo com os perfis de inibição obtidas com os diferentes inibidores de protease, foi confirmado que a protease ácida purificado pertence ao tipo de protease aspártica.

Palavras-chave: *Aspergillus foetidus*, protease aspártica, purificação, cromatografia.

1. INTRODUÇÃO

As proteases (peptidases ou proteinases) são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações peptídicas de uma molécula de proteína. Proteases que atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, são

chamadas de endopeptidases, e as proteases que clivam as ligações nos finais das cadeias polipeptídicas na região N e C terminal são classificadas como exopeptidases (LOPEZ-OTIN e BOND, 2008). Elas também podem ser classificadas como proteases aspártica, cisteína, serina, glutâmica, treonina e asparagina, dependendo do aminoácido presente no sítio ativo, ou classificada como metaloprotease se um íon metal é necessário para a atividade catalítica (SUMANTHA, LARROCHE e PANDEY, 2006).

Proteases ocorrem naturalmente em todos os organismos e estão envolvidas em muitos processos fisiológicos, incluindo a produção de nutrientes para o crescimento e proliferação das células (LIN *et al.*, 2011), degradação de proteínas (CIECHANOVER, 2005), e como componentes reguladores para diversas funções fisiológicas (EHRMANN e CLAUSEN, 2004; OIKONOMOPOULOU *et al.*, 2006). Proteases de origem microbiana são importantes enzimas comerciais que correspondem aproximadamente 60% do total do mercado de enzimas industriais, e são utilizadas na área de alimentos, indústria farmacêutica, detergentes, e da biotecnologia (RAO *et al.*, 1998). Proteases ácidas comercialmente importantes são produzidas a partir de fungos filamentosos, e a demanda industrial por estas enzimas está crescendo rapidamente para aplicações em diversas áreas (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000). Elas são utilizadas em diferentes processos industriais tais como no processamento do couro (KANTH *et al.*, 2009) e de alimentos (TAVANO, 2013) bem como na indústria farmacêutica (BRANDELLI, DAROIT e RIFFEL, 2010). Recentemente, proteases ácidas foram identificadas na pele e associadas ao processo de descamação, e algumas delas com capacidade para induzir a esfoliação estão entre os potenciais compostos ativos nos produtos cosméticos (BERNARD *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2007).

Proteases aspárticas (EC 3.4.23), também conhecidas como proteases ácida, são uma subfamília das endopeptidases que estão sendo isoladas de várias fontes, como vírus, bactéria, fungos, plantas e animais (CHEN, J. *et al.*, 2009). Diversas proteases aspártica de fungos estão sendo purificadas e caracterizadas como enzimas reninas e pepsinas (RAO *et al.*, 1998). As reninas são produzidas a partir das espécies *Endothia parasitica* (endotiapepsina, EC 3.4.23.22), *Mucor*, e *Rhizomucor* (mucorpepsina, EC 3.4.23.23) (YEGIN *et al.*, 2011). As pepsinas incluem a aspergillopepsina (aspergillopepsina I, EC 3.4.23.18) da espécie

Aspergillus species (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009) e a rizopuspepsina (EC 3.4.23.21) a partir de *Rhizopus* species (KUMAR *et al.*, 2005). Estas enzimas possuem pesos moleculares entre 30 e 50 kDa e contêm um ou dois resíduos de ácido aspártico conservados no sítio ativo (SUMANTHA, LARROCHE e PANDEY, 2006). Proteases aspárticas possuem atividade ótima em pH ácido (pH 3 - 5) e são inibidas especialmente pela pepstatina A (KUMAR *et al.*, 2005; CHEN, J. *et al.*, 2009; VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009). No entanto, não há relatos sobre proteases ácidas produzidas pelo fungo *A. foetidus*. Dessa forma, o objetivo desse trabalho é a produção, purificação e caracterização parcial de uma protease ácida extracelular produzida por um fungo isolado do cerrado brasileiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

Azocaseína, fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF), iodoacetamida, pepstatina A, caseína, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido tricloroacético (TCA) foram adquiridos por Sigma Aldrich Chemical Company, EUA. A coluna de cromatografia, Sephacryl S-200, foi adquirida por GE Healthcare Biosciences (Uppasala, Suíça).

2.2. Micro-organismo e condições de cultivo

A cepa de *Aspergillus foetidus* foi identificada fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Esta cepa foi isolada do cerrado da região do centro-oeste brasileiro e encontra-se depositada na Micoteca do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília dentro do âmbito da rede SisBiota Brasil (Sistema Nacional de Pesquisa em Biodiversidade – CNPq) de fungos filamentosos com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético número 010770/2013-5 sob supervisão do Professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho.

Como foi sugerido no estudo de otimização anterior, culturas submersas foram realizadas durante 7 dias a 28 °C e 150 rpm, utilizando peptona 2% (p/v) como substrato. Para esta finalidade, discos de micélio (4 mm) obtidos do pré-cultivo em placa de Petri de 7 dias contendo PDA foram utilizados como inóculo. O meio de cultura e os micélios foram filtrados sob vácuo através de papel de filtro Whatman nº 1 em funil de Buchner. O sobrenadante foi liofilizado e o extrato enzimático foi utilizada como fonte de enzima para a purificação.

2.3. Determinação da atividade de protease

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por CHARNEY e TOMARELLI (1947), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 500 µL do filtrado a 37°C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 min pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 3000 rpm por 10 min, e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min.

2.4. Efeito do pH na atividade de protease

Para investigar o efeito do pH (5,0 - 9,0) na atividade de protease, a solução de azocaseína 0,5% (p/v) dissolvida, de acordo com o pH selecionado, em tampão acetato de sódio 0,2 M (pH 5,0), fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,0 - 8,0), ou carbonato de sódio 0,2 M (pH 9,0). Todas os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ DP (Desvio Padrão).

2.5. Purificação da proteína

A purificação foi realizada no equipamento AKTA Pure system (GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Suíça). O extrato enzimático liofilizado foi dissolvido em 5 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5, e filtrado através do filtro Millex-HA 13 mm (Millipore, Bedford, MA) com tamanho do poro de 0,22 μ m. O extrato bruto foi aplicado na coluna de permeação em gel Sephacryl S-200 (GE Healthcare Biosciences) previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5. O mesmo tampão utilizado para equilibrar a coluna foi aplicado como eluente da amostra sob um fluxo de 1 mL/min. Os picos foram monitorados a 214, 280 e 340 nm. Um total de 70 frações de 2 mL cada foram coletadas e as frações foram analisadas quanto à atividade de protease como descrito no item 2.3.

2.6. Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O grau de pureza das amostras enzimáticas foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (p/v) contendo SDS 0,1% (p/v) sob condições desnaturantes. As amostras foram previamente submetidas à precipitação por solução de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v) e incubadas por 1 h a 10 °C. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 14.000 g por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas por duas vezes com 1,0 mL/tubo de acetona P.A. refrigerada e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos, para secagem.

Após este período, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de tampão de amostra [tris-HCl 312 mM, pH 7; SDS 2,0% (p/v); azul de bromo fenol 0,05% (p/v); glicerol 20% (v/v) e β-mercaptoetanol 5,0% (v/v)]. A mistura foi aquecida por três minutos a 98°C. A eletroforese foi realizada em tampão [tris-HCl 25 mM, glicina 200 mM e SDS 0,075% (p/v), pH 8,3 após diluição], à temperatura ambiente, submetida a 25 mA por 40 minutos. O marcador de massa molecular *Low Molecular Weight* (LMW) (GE Healthcare) contendo as proteínas fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α-lactalbumina (14,4 kDa) foi utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes. Os géis foram corados com solução de coloração azul *Coomassie Brilliant*. A quantidade de proteína total foi determinada utilizando albumina de soro bovino como padrão (Bradford, 1976).

2.7. Zimograma

As amostras enzimáticas foram submetidas à técnica de zimograma através da eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes a 12% (v/v), como descrito no item 2.6 do presente capítulo, co-polimerizado com solução de caseína 0,2% (p/v). O preparo das amostras também foi realizado como descrito no item 2.6 do presente capítulo. Após a eletroforese, o gel foi incubado duas vezes em solução Triton® X-100 1% (v/v) por 30 minutos cada a 28°C. Em seguida, o gel foi lavado com água destilada e incubado em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0 por 24 h a 55°C. Por fim, o gel foi imerso em solução *Coomassie Brilliant Blue R-250* e descorado com água destilada até o aparecimento das bandas.

2.8. Efeito de inibidores de protease e de íons metálicos na atividade enzimática

O efeito de vários inibidores de protease sobre a hidrólise de caseína foi observado para identificar a classe da enzima. Os inibidores utilizados eram

específicos para as serino proteases (PMSF), cisteíno proteases (iodoacetamida), protease aspártica (pepstatina A) e metaloproteases (EDTA). Os seguintes íons metálicos, numa concentração de 1 mM (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Ag^{+}) foram adicionados para a determinação dos seus efeitos sobre a atividade da enzima. Em cada caso, a enzima foi incubada na presença do inibidor / metal em tampão de acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, durante 30 min a 37 °C e atividade de protease foi quantificada conforme descrito no item 2.3 do presente capítulo. Os desvios-padrão foram calculados como percentuais da média para o ensaio correspondente. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que o valor de 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de inibidores e íons metálicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Purificação e parcial caracterização da protease aspártica

Uma solução do extrato enzimático que apresenta atividade de protease aspártica (63,7 U/ml) foi separada por cromatografia utilizando a coluna Sephacryl S-200 e eluída com tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. A Figura 20 apresenta o perfil cromatográfico. Existem dois picos principais de proteína, e a maior atividade de protease foi detectada nas frações 28-43. A atividade das frações reunidas foi de 64,8 U/ml, o que representa um rendimento de 101,7% da atividade da enzima inicial. Um resumo dos passos de purificação para a protease aspártica é apresentado na Tabela 14. Depois do passo de purificação de cromatografia de coluna, a enzima foi purificada 16,8 vezes a partir de um extrato bruto e foi observada uma atividade específica de 248,14 U/g. Proteases aspárticas purificadas a partir de *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009) e *Aspergillus niger* BCRC 32720 (YIN, HSU e JIANG, 2013) demonstraram atividade de protease com atividades específicas de $43,6 \times 10^3$ U/mg e $23,3 \times 10^3$ U/mg, respectivamente.

Figura 20. Perfil da cromatografia em coluna de permeação em gel Sephacryl S-200 para (•) atividade de protease ácida e (■) proteína presente no extrato bruto do fungo *A. foetidus*.

Tabela 14. Purificação da protease ácida do fungo *A. foetidus*.

Etapas da purificação	Proteína total (g/mL)	Atividade ^a (U/mL)	Atividade específica (U/g)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	4,327	63,7	14,722	1	100
Pico 1 - Sephacryl S-200	0,261	64,8	248,140	16,85	101,72

^aDefinição de uma unidade: uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima, de acordo com as condições do ensaio descritas, que dá origem a um aumento de uma unidade de absorbância a 430 nm/min. Azocaseína (0,5% p/v) foi utilizado como substrato.

As frações ativas reunidas (33-39), foram utilizadas para a análise de SDS-PAGE e a pureza da enzima foi confirmada. A proteína purificada migrou como uma única banda com um peso molecular aparente de 50,6 kDa (Figura 21A). O peso molecular da enzima purificada, é mais elevada do que as relatadas para proteases de *Aspergillus parasiticus* (36 kDa) *Aspergillus parasiticus* (36 kDa) (ANITHA e PALANIVELU, 2013), *A. oryzae* BCRC 30118 (41 kDa) (YIN, CHOU e JIANG, 2013), *R. oryzae* MTCC 3690 (34 kDa) (KUMAR *et al.*, 2005), *R. oryzae* NBRC 4749 (34 kDa) (CHEN, C.-C. *et al.*, 2009), e *R. microsporus* (34.5 kDa) (SCHOEN *et al.*, 2002). Estes resultados sugerem que a protease purificada de *A. foetidus* é uma diferente daquelas encontradas na literatura.

A natureza proteolítica da enzima foi também confirmada por zimografia utilizando caseína como substrato, onde a caseína hidrolisada apareceu como uma faixa branca que corresponde à posição da protease no gel (Figura 21B).

Figura 21. (A) Análise de SDS-PAGE da purificação da protease ácida. Coluna 1 - marcadores de peso molecular baixo (14.4- 97.4 kDa, GE-Lifesciences), coluna 2 - protease ácida purificado por cromatografia de coluna Sephacryl S-200. (B) Zimograma da protease ácida. A região clara (indicado pela seta) mostra a hidrólise de caseína por esta enzima.

3.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da protease ácida

A atividade de protease da enzima purificada foi realizada a uma temperatura de 37 °C variando o pH entre 5,0 e 10,0, utilizando azocaseína como substrato, na concentração de 5 g/L (Figura 22). Semelhante aos resultados obtidos com o extrato bruto da enzima, a protease apresentou alta atividade a pH 5,0 (51,60 U/ml). Este pH ótimo de atividade da protease ácida têm sido também relatado para os fungos *Aspergillus awamori* (NEGI e BANERJEE, 2009), *Mucor circinelloides* (ANDRADE, V. S. et al., 2002), *Penicillium griseoroseum* IH-02 (IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2007), *Penicillium roqueforti* (LARSEN, KRISTIANSEN e HANSEN, 1998), *Rhizopus*

oryzae (KUMAR et al., 2005) e *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (MERHEB-DINI et al., 2010).

Figura 22. Efeito do pH na atividade da protease ácida purificada.

A temperatura ótima de atividade da protease foi identificada através da realização de testes em pH 5,0, usando azocaseína como substrato, na concentração de 5 g/L e variando a temperatura entre 30 e 70 °C. A protease mostrou-se ativa ao longo de um intervalo de temperaturas relativamente grande (30-60 °C), com um valor ótimo a 55 °C (Figura 23), o mesmo que o observado nos estudos com o extrato bruto da enzima. Esta temperatura ótima foi também previamente relatada para as espécies *Aspergillus awamori* (NEGI e BANERJEE, 2009), *Aspergillus clavatus* ES1 (HAJJI et al., 2007), *Aspergillus fumigatus* (SILVA, RODRIGUES e CABRAL, 2010) e *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 (VISHWANATHA, RAO e SINGH, 2009).

Figura 23. Efeito da temperatura na atividade da protease ácida purificada.

3.3. Efeito de inibidores de protease, íons metálicos e detergentes na atividade da protease ácida.

A função de ativação ou inibição de compostos químicos ou íons constitui uma ferramenta de grande utilidade na caracterização da estrutura e as possíveis interações que ocorrem no sítio ativo e o mecanismo de ação de enzimas. Para caracterizar a protease ácida purificada, foram avaliados os efeitos de vários inibidores sobre a atividade enzimática. A protease purificada foi fortemente inibida por pepstatina A, um inibidor de hexapéptidos que se liga especificamente e irreversivelmente ao aspartato dentro do sítio ativo da protease aspártica, com completa inativação ocorrendo a uma concentração do inibidor de 1 mM (Tabela 15). Além disso, os inibidores de serina (PMSF) e de cisteína (iodoacetamida) não inibiram a atividade enzimática mesmo na concentração de 1 mM. O agente quelante EDTA (10 mM) não teve efeito na atividade, sugerindo que a enzima não é uma metaloprotease. Uma forte inibição pelo inibidor pepstatina sugere que a proteína purificada pode ser classificada como uma protease aspártica.

O efeito de diferentes íons metálicos (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Ag^{+}) na concentração de 1 mM sobre a atividade da protease ácida também foi avaliado (Tabela 15). A enzima mostrou-se estável em relação a todos os íons metálicos

testados. A ativação da enzima pelos íons metálicos divalentes, especialmente o íon Ca^{2+} , ocorre principalmente por causa do seu papel na estabilização da estrutura terciária da enzimas. Estes resultados indicam que a atividade da enzima purificada não é metalo-dependente. Os íons metálicos têm diferentes efeitos sobre a atividade das proteases aspárticas do diferentes fungos. A enzima rhizopuspepsina do fungo *R. chinensis* foi significativamente inibida pelo íon Fe^{3+} , enquanto que nenhuma inibição ocorreu com na presença dos íons Cu^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+} , e Pb^{2+} (FUKUMOTO, DAISUKE e YAMAMOTO, 1967). A adição do íon Ca^{2+} na concentração de 1 mM não teve efeito na atividade enzimática, enquanto que os íons Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , e Co^{2+} reduziram levemente a atividade da protease aspártica do fungo *Rhizopus oryzae* (HSIAO *et al.*, 2014). A enzima produzida pela espécie *A. niger* BCRC 32720^o foi fortemente ativada pelo íon Fe^{2+} e inibida pelos íons Fe^{3+} , Cr^{3+} , Sb^{3+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Sr^{2+} , e Ag^+ inibiram (YIN, HSU e JIANG, 2013), enquanto que o íon Cu^{2+} inibiu a protease produzida pelo fungo *A. niger* I1 (SIALA *et al.*, 2009).

Tabela 15. Efeito de inibidores de protease e íons metálicos na atividade da protease purificada.

Compostos	Concentração	Atividade relativa(%)
Controle		100 ± 0.15
Pepstatina A	1 mM	9.0 ± 0.01
Iodoacetamina	5 mM	101.5 ± 0.04
EDTA	5 mM	98.3 ± 0.06
PMSF	1 mM	71.1 ± 0.04
CuSO_4	1 mM	122.1 ± 0.5
MgCl_2	1 mM	148.2 ± 0.02
CaCl_2	1 mM	110.0 ± 0.01
ZnSO_4	1 mM	158.2 ± 0.11
FeCl_3	1 mM	186.8 ± 0.13
AgCl	1 mM	153.1 ± 0.22
SDS	1 mM	109.5 ± 0.01

4. CONCLUSÃO

No presente estudo, a protease ácida produzida pelo fungo *A. foetidus* em cultivo submerso contendo peptona foi purificada e caracterizada. Foi possível caracterizar uma protease ácida de 50,6 kDa apresentando atividade ótima em pH 5,0 e temperatura em 55 °C. A enzima foi classificada como uma protease aspártica, com base na inibição observada na presença de pepstatina. A protease aspártica foi purificada por cromatografia líquida utilizando uma coluna de permeação em gel Sephacryl S-200, o que resultou num aumento de 16,8 vezes na atividade específica e um rendimento de 101,7%. A enzima pode ser potencialmente produzida em grandes quantidades e também encontrar aplicações nas indústrias cosmética e farmacêutica para o tratamento de acne, queratoses, cicatrizes e psoríase.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A triagem realizada quanto à capacidade de produção de proteases de 17 fungos filamentosos isolados de cerrado demonstrou que 09 espécies apresentavam atividade proteolítica em meio de cultura contendo ágar-leite. O fungo *A. foetidus* apresentou os melhores resultados para a produção enzimática em meio líquido, sendo selecionado para o estudo de otimização da produção de protease ácida extracelular.

O estudo de otimização demonstrou que as melhores condições para a produção de proteases pelo fungo filamentoso *A. foetidus* foram com pH inicial do meio igual a 7,0, uma velocidade de agitação de 150 rpm, uma temperatura de 28 °C, e um tempo de fermentação de 168 h. Entre as várias fontes de carbono e nitrogênio testadas, o meio com peptona 2% (p/v) foi o substrato mais adequado para a produção de protease ácida extracelular.

A avaliação comparativa do rendimento de protease em condições otimizadas mostrou uma produção da enzima cerca de 20 vezes maior do que a obtida sob condições não otimizadas. Estes resultados são bastante promissores para o futuro desenvolvimento da produção em larga escala de protease ácida por *A. foetidus*.

A protease presente no meio, produzida pelo fungo apresentou atividade ótima a pH igual a 5,0 e temperatura ótima de 55°C. Estes valores ótimos de pH e temperatura foram confirmados com a protease purificada posteriormente, sendo de grande importância para aplicação farmacêutica.

Na determinação das propriedades cinéticas e termodinâmicas das proteases extracelulares produzidas por *A. foetidus*, observou-se uma excelente estabilidade térmica da enzima com valor de meia-vida longo ($t_{1/2} = 37,74$ h). Os parâmetros termodinâmicos da desnaturação irreversível da enzima demonstraram uma excelente estabilidade térmica da enzima, que poderia ser explorada de forma lucrativa para futuras aplicações industriais, especialmente nos setores de cosméticos e farmacêuticos.

O trabalho também contribuiu para o conhecimento das espécies de fungos filamentosos presentes no bioma cerrado. Muitas dessas espécies estão sendo estudadas quanto à produção de diversas enzimas (xilanases, hemicelulases, β -galactosidases, asparaginases) utilizando diferentes tipos de substratos,

demonstrando a importância desses fungos para diversos processos biotecnológicos de interesse para a indústria. Portanto, os resultados mostrados nesse trabalho podem servir como base para o desenvolvimento de novos estudos com espécies de fungos filamentosos isolados do bioma cerrado.

PERSPECTIVAS FUTUTRAS

- Avaliar o aumento de escala utilizando outros tipo de biorreatores ou processos de fermentação para a produção de protease pelo fungo *A. foetidus*.
- Finalizar o estudo de caracterização físico-química da protease purificada, avaliando K_m , V_{max} , especificidade ao substrato e estabilidade térmica.
- Realizar estudos de citotoxicidade da enzima purificada.
- Realizar estudos para a incorporação da enzima purificada em cosméticos.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, F. *et al.* . Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochem**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P. Response surface optimization of the critical medium components for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. **J Pharm Pharm Sci**, v. 5, n. 3, p. 272-8, 2002.
- ALEKSIEVA, P.; PEEVA, L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. **Enzym Microb Technol**, v. 26, p. 402–405, 2000.
- ANDRADE, V. *et al.* . Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 106-110, 2002.
- ANDRADE, V. S. *et al.* . Production of extracellular proteases by *Mucor circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 106-110, 2002.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expr Purif**, v. 88, n. 2, p. 214-20, 2013.
- BARATA, R. A. *et al.* . Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-Like Protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **J Biosci Bioeng**, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.
- BELMESSIKH, A. *et al.* . Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 44, p. 377–385, 2013.
- BENDICHO, S. *et al.* . Determination of proteolytic activity in different milk systems. **Food Chemistry**, v. 79, p. 245–249, 2002.
- BERNARD, D. *et al.* . Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called "stratum corneum thiol protease" as cathepsin 12. **J Invest Dermatol**, v. 120, n. 4, p. 592-600, 2003.

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

BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of extracellular protease by *Aspergillus tamarii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 75-81, 2000.

BOYCE, A.; WALSH, G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. **Chemosphere**, v. 88, n. 2, p. 211-8, 2012.

BRAGA, A. A.; DE MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R. Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinases production. **Syst Appl Microbiol**, v. 21, n. 3, p. 353-9, 1998.

BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1735-50, 2010.

BRUCE, E. M. Inhibitors of serine proteases as potential therapeutic agents: the road from thrombin to tryptase to cathepsin G. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 10, p. 769–787, 2004.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical–chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20-25, 2013.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Bioprocess Parameters and Oxygen Transfer Characteristics in β -Lactamase Production by *Bacillus* Species. **Biotechnology progress**, v. 20, n. 2, p. 491-499, 2004.

CHAO, Y. P. *et al.* . Screening for a new *Streptomyces* strain capable of efficient keratin degradation. **J Environ Sci (China)**, v. 19, n. 9, p. 1125-8, 2007.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, v. 171, n. 2, p. 501-5, 1947.

CHEN, C.-C. *et al.* . Purification and Characterization of a New Rhizopuspepsin from *Rhizopus oryzae* NBRC 4749. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 57, n. 15, p. 6742-6747, 2009.

CHEN, J. *et al.* . Aspartic proteases gene family in rice: gene structure and expression, predicted protein features and phylogenetic relation. **Gene**, v. 442, n. 1, p. 108-118, 2009.

CHI, Z. *et al.* . Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresour Technol**, v. 98, n. 3, p. 534-8, 2007.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 6, n. 1, p. 79-87, 2005.

CONVERTI, A. *et al.* . Reactivity and stability of mycelium-bound carboxylesterase from *Aspergillus oryzae*. **Biotechnol Bioeng**, v. 77, n. 2, p. 232-7, 2002.

CORZO, C. A.; WALISZEWSKI, K. N.; WELTI-CHANES, J. Pineapple fruit bromelain affinity to different protein substrates. **Food Chemistry**, v. 133, n. 3, p. 631-635, 2011.

DE CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, n. 0, 2014.

DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of microorganisms to industrial biology. **Mol Biotechnol**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2008.

DURAND-POUSSEREAU, N.; FEVRE, M. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. **J Biotechnol**, v. 51, n. 1, p. 97-105, 1996.

EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. **Annu. Rev. Genet.**, v. 38, p. 709-724, 2004.

EL-ENSHASY, H.; KLEINE, J.; RINAS, U. Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2103-2112, 2006.

EL-ENSHASY, H. A. Filamentous Fungal Cultures—Process Characteristics, Products, and Applications. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources, New Technologies and Applications**, v. 9, p. 225-261, 2007.

ERAZO, R.; CARDENAS, J. Determinacion experimental del coeficiente de transferencia de oxigeno kLa en un biorreactor batch. **Rev.per quim.**, v. 4, n. 2, p. 22-27, 2001.

FAKHFAKH-ZOUARI, N. *et al.* . Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617-626, 2010.

FARLEY, P. C.; IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxyl proteinase. **J Gen Microbiol**, v. 138, n. 12, p. 2539-44, 1992.

FARNELL, E. *et al.* . Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. **Fungal Biol**, v. 116, n. 9, p. 1003-12, 2012.

FAVELA-TORRES, E. *et al.* . Kinetics of growth of *Aspergillus niger* during submerged, agar surface and solid state fermentations. **Process Biochem**, v. 33, n. 2, p. 103-107, 1998.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; DE MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In: SUMMA, L. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 2004. p.327-347.

FUKUMOTO, J.; DAISUKE, T.; YAMAMOTO, T. Studies on Mold Protease. Part I: Purification, crystallization and some enzymatic properties of acid protease of *Rhizopus chinensis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 710-717, 1967.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil Biol Biochem**, v. 40, p. 3040-3048, 2008.

GEOK, L. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. **Biochemical Engineering Journal** v. 13, n. 1, p. 73-77, 2003.

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

GIBBS, P. A.; SEVIOUR, R. J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Crit Rev Biotechnol**, v. 20, n. 1, p. 17-48, 2000.

GOHEL, S. D.; SINGH, S. P. Purification strategies, characteristics and thermodynamic analysis of a highly thermostable alkaline protease from a salt-tolerant alkaliphilic actinomycete, *Nocardiosis alba* OK-5. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, v. 889-890, p. 61-8, 2012.

GOMBERT, A. K. *et al.* . Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochem**, v. 35, p. 85-90, 1999.

GONZALEZ-RABADE, N. *et al.* . Production of plant proteases in vivo and in vitro--a review. **Biotechnol Adv**, v. 29, n. 6, p. 983-96, 2011.

GOPINATHAN, U. *et al.* . Enzymatic, clinical and histologic evaluation of corneal tissues in experimental fungal keratitis in rabbits. **Exp Eye Res**, v. 72, n. 4, p. 433-42, 2001.

GRAND VIEW RESEARCH, I. **Global Enzymes Market By Product (Carbohydrase, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases) Expected to Reach USD 7,652.0 Million by 2020** 2014.

GUPTA, R. *et al.* . An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, n. 4, p. 381-95, 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HADDAR, A. *et al.* . Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. **J Biosci Bioeng**, v. 110, n. 3, p. 288-294, 2010.

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

HAJJI, M. *et al.* . Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochem**, v. 42, p. 791–797, 2007.

HAJJI, M. *et al.* . Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in Mirabilis jalapa tuber powder using statistical experimental design. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 79, n. 6, p. 915-23, 2008.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresour Technol**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

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

HISS, H. Cinética de Processos Fermentativos. In: SCHMIDELL, W. (Ed.). **Biotechnologia industrial**. São Paulo: Blucher, v.2, 2001. cap. 6,

HMIDET, N. *et al.* . Alkaline proteases and thermostable α -amylase co-produced by *Bacillus licheniformis* NH1: Characterization and potential application as detergent additive. **Biochemical Engineering Journal**, v. 47, p. 71–79, 2009.

HSIAO, N.-W. *et al.* . Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89-94, 2014.

IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. **Pak. J. Bot.**, v. 39, n. 7, p. 2717-2724, 2007.

JAOUADI, B. *et al.* . Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. **Biochim**, v. 90, n. 9, p. 1291-305, 2008.

JARAI, G.; BUXTON, F. Nitrogen, carbon, and pH regulation of extracellular acidic proteases of *Aspergillus niger*. **Curr Genet**, v. 26, n. 3, p. 238-44, 1994.

JENSEN, B. *et al.* . Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnol Lett**, v. 24, p. 41-45, 2002.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochem**, v. 37, p. 139–144, 2001.

JOO, H.-S. *et al.* . Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 155-159, 2002.

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

KANNAHI, M.; ANCY, R. J. Keratin degradation and enzyme producing ability of *Aspergillus flavus* and *Fusarium solani* from soil. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 4, n. 6, p. 3245-3248, 2012.

KANTH, S. V. *et al.* . Kinetics of leather dyeing pretreated with enzymes: role of acid protease. **Bioresour Technol**, v. 100, n. 8, p. 2430-5, 2009.

KILONZO, P. M.; MARGARITIS, A. The effects of non-Newtonian fermentation broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: a critical review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 17, n. 1, p. 27-40, 2004.

KITANO, H. *et al.* . Specific expression and temperatura-dependent expression of the acid protease-encoding gene (pepA) in *Aspergillus oryzae* in solid-state culture (Rice-Koji). **J Biosci Bioeng**, v. 93, n. 6, p. 563-7, 2002.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 147-155, 2005.

KRANTHI, V. S.; RAO, D. M.; JAGANMOHAN, P. Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. **Int J Microbiol Res**, v. 3, n. 1, p. 12-15, 2012.

KUCERA, M. The Production of Toxic Protease by the Entomopathogenous Fungus *Metarhizium anisopliae* in Submerged Culture. **J Invertebr Pathol**, v. 38, p. 33-38, 1981.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv**, v. 17, p. 561–594, 1999.

KUMAR, S. *et al.* . Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochem**, v. 40, p. 1701–1705, 2005.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chem**, v. 131, p. 1295–1303, 2012.

LARSEN, M. D.; KRISTIANSEN, K. R.; HANSEN, T. K. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. **Int J Food Microbiol**, v. 43, n. 3, p. 215-21, 1998.

LAXMAN, R. S. *et al.* . Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. **Process Biochem**, v. 40, p. 3152–3158, 2005.

LAXMANAN, S. *et al.* . CD40: a mediator of pro- and anti-inflammatory signals in renal tubular epithelial cells. **J Am Soc Nephrol**, v. 16, n. 9, p. 2714-23, 2005.

LI, D.; YANG, Y.; SHEN, C. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycol. Res.**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LIN, J.-S. *et al.* . Purification and characterization of a novel extracellular tripeptidyl peptidase from *Rhizopus oligosporus*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 20, p. 11330-11337, 2011.

LODS, L. M. *et al.* . The future of enzymes in cosmetics. **Int J Cosmet Sci**, v. 22, n. 2, p. 85-94, 2000.

LOPEZ-OTIN, C.; BOND, J. S. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **J Biol Chem**, v. 283, n. 45, p. 30433-7, 2008.

MACCHIONE, M. M. *et al.* . Protease production by different thermophilic fungi. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 146, n. 1-3, p. 223-30, 2008.

MACHADO, R. B. *et al.* . Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Relatório Conservação Internacional**, p. 1-23, 2004.

MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent. **Appl Environ Microbiol**, v. 57, n. 3, p. 712-6, 1991.

MANDUJANO-GONZALEZ, V. *et al.* . Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. **Protein Expr Purif**, v. 92, n. 2, p. 214-22, 2013.

MANIVANNAN, S.; KATHIRESAN, K. Alkaline protease production by *Penicillium fellutanum* isolated from Mangrove Sediment. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 2, p. 98-103, 2007.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. John Wiley & Sons, 2003. ISBN 0471461415.

MAZOTTO, A. M. *et al.* . Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.

MCINTYRE, M. *et al.* . Metabolic engineering of the morphology of *Aspergillus*. In: (Ed.). **Metabolic engineering**: Springer, 2001. p.103-128. ISBN 3540418482.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Kinetic studies on the multi-enzyme solution produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 80, p. 76-82, 2013.

MERHEB-DINI, C. *et al.* . Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 (Milk-clotting protease from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31). **Food Chem**, v. 120, p. 87-93, 2010.

MERHEB, C. W. *et al.* . Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chem**, v. 104, p. 127–131, 2007.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal Chem**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONOD, M. *et al.* . Secreted proteases from pathogenic fungi. **Int J Med Microbiol**, v. 292, n. 5-6, p. 405-19, 2002.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Res Int**, v. 42, p. 443–448, 2009.

O'DONNELL, D. *et al.* . Enhanced heterologous protein production in *Aspergillus niger* through pH control of extracellular protease activity. **Biochem Eng J**, v. 8, p. 187–193, 2001.

OIKONOMOPOULOU, K. *et al.* . Proteinase-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs) by kallikreins and more. **Biological chemistry**, v. 387, n. 6, p. 677-685, 2006.

OLIVIERI, F. *et al.* . Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 63-72, 2002.

OLSVIK, E.; KRISTIANSEN, B. Rheology of filamentous fermentations. **Biotechnology advances**, v. 12, n. 1, p. 1-39, 1994.

ONCU, S.; TARI, C.; UNLUTURK, S. Effect of various process parameters on morphology, rheology, and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in a batch bioreactor. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 4, p. 836-845, 2007.

PAMBOUKIAN, C. R. D. **Produção do antitumoral rentamicina por *Streptomyces olindenses* em processos descontínuos**. 2003. (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós Graduação em Engenharia, USP

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 1271-1278, 2002.

PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S. P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3569–3575, 2005.

PEREIRA, C. I.; CRESPO, M. T.; ROMAO, M. V. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. **Int J Food Microbiol**, v. 68, n. 3, p. 211-6, 2001.

PETERSEN, N. *et al.* . Multivariate models for prediction of rheological characteristics of filamentous fermentation broth from the size distribution. **Biotechnology and Bioengineering (Print)**, v. 100, n. 1, p. 61-71, 2008.

POZA, M. *et al.* . Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **J Appl Microbiol**, v. 91, n. 5, p. 916-21, 2001.

RAMAMOORTHY SATHISH KUMAR; ANANTHAN, G.; PRABHU, A. S. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GACAS9 using response surface methodology – A statistical approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 191-197, 2013.

RAMAMURTHY, V.; UPADHYAY, C. M.; KOTHARI, R. M. An optimized protocol for the preparation and application of acid protease. **J Biotechnol**, v. 21, p. 187-196, 1991.

RAO, M. B. *et al.* . Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAO, Y. K. *et al.* . Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochem Eng J**, v. 28, p. 57–66, 2006.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado Vegetation and Threats to its Biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, p. 223-230, 1997.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D343-50, 2012.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: SPRINGER (Ed.). **Industrial Enzymes Structure, Function and Applications**, 2007. p.161-179.

RODARTE, M. P. *et al.* . Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

ROELS, J. Energetics and kinetics in biotechnology. 1983.

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

SAQIB, A. A. *et al.* . Thermostability of crude endoglucanase from *Aspergillus fumigatus* grown under solid state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF). **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 641-646, 2010.

SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. **J Biochem Biophys Methods**, v. 70, n. 4, p. 697-9, 2007.

SARASWATHY, A.; HALLBERG, R. Mycelial pellet formation by *Penicillium ochrochloron* species due to exposure to pyrene. **Microbiol Res**, v. 160, n. 4, p. 375-83, 2005.

SAVITHA, S. *et al.* . Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 42, p. 298–304, 2011.

SCHMIDELL, W. E. A. biotecnologia industrial. **edgard blucher ltda**, v. 2, 2001.

SCHOEN, C. *et al.* . Molecular cloning of an extracellular aspartic proteinase from *Rhizopus microsporus* and evidence for its expression during infection. **Medical Mycology**, v. 40, n. 1, p. 61-71, 2002.

SHAN, L. *et al.* . Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochem J**, v. 383, n. Pt 2, p. 311-8, 2004.

SHAN, L. *et al.* . Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-9, 2002.

SHATA, H. M. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Pol J Microbiol**, v. 54, n. 3, p. 241-7, 2005.

SIALA, R. *et al.* . Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 18, 2009.

SILVA, D. C. V. *et al.* . Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 34, n. 4, p. 607-610, 2011.

SILVA, R. R.; RODRIGUES, A.; CABRAL, H. Investigation of Liquid and Solid Fermentation Processes of the Fungus *Aspergillus fumigatus* for Protease Production. **J Biotechnol**, v. 150S n. S1–S576, 2010.

SIM, Y.-C. *et al.* . Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 137-140, 2000.

SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 781–785, 2001.

SMITH, W. P. *et al.* . Topical proteolytic enzymes affect epidermal and dermal properties. **Int J Cosmet Sci**, v. 29, n. 1, p. 15-21, 2007.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TEIXEIRA, M. F. S. *et al.* . Determinação qualitativa de proteases: método de cupplate modificado. **Rev. UFAM. Série: Ciências da Saúde**, v. 4/5 (1/2), p. 39-45, 1996.

TELLO-SOLIS, S. R.; HERNANDEZ-ARANA, A. Effect of irreversibility on the thermodynamic characterization of the thermal denaturation of *Aspergillus saitoi* acid proteinase. **Biochem J**, v. 311 (Pt 3), p. 969-74, 1995.

TOMAR, R.; KUMAR, R.; JAGANNADHAM, M. V. A stable serine protease, wrightin, from the latex of the plant *Wrightia tinctoria* (Roxb.) R. Br.: purification and biochemical properties. **J Agric Food Chem**, v. 56, n. 4, p. 1479-87, 2008.

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

VAN DEN HOMBERGH, J. P. T. W. *et al.* . *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 7, p. 256–263, 1997.

VERMELHO, A. B. *et al.* . Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 6, p. 755-60, 1996.

VERMELHO, A. B. *et al.* . Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: INTERCIÊNCIA (Ed.). **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado.** , 2008. p.273-287.

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: sources, uses, and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 65, n. 1, p. 1-43, 2001.

VIGNARDET, C. *et al.* . Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm**, v. 224, n. 1-2, p. 115-22, 2001.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. *et al.* . Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003.

VISHWANATHA, K. S. **Acid protease from *Aspergillus oryzae*: Structure-stability and enhancement of the activity by physical, chemical and molecular biological approaches.** 2009. 266 (Doctor of Philosophy in Biochemistry). Central Food Technology Research Institute, Department of Protein Chemistry and Technology.

VISHWANATHA, K. S.; APPU RAO, A. G.; SINGH, S. A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 6, p. 1849-59, 2010.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, n. 2, p. 129-38, 2010.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A. G. A.; SINGH, S. A. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chem**, v. 114, p. 402–407, 2009.

WANG, L. *et al.* . Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 2, p. 115-129, 2005.

WANG, R.; LAW, C. S. R.; WEBB, C. Protease production and conidiation by *Aspergillus oryzae* in flour fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 217-227, 2005.

WARD, O. P. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. **Biotechnology Advances**, 2011.

WU, T. Y. *et al.* . Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. **Enzym Microb Technol**, v. 39, p. 1223-1229, 2006.

YAMAGUCHI, M. *et al.* . Specificity and molecular properties of penicillolysin, a metalloproteinase from *Penicillium citrinum*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1317-21, 1993.

YAMAMOTO, N. *et al.* . A heat-labile serine proteinase from *Penicillium citrinum*. **Phytochem**, v. 32, n. 6, p. 1393-7, 1993.

YANG, F.; LIN, I. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. **Enzym Microb Technol**, v. 23, p. 397-402, 1998.

YEGIN, S. *et al.* . Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949-960, 2011.

YIN, L.-J.; CHOU, Y.-H.; JIANG, S.-T. Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology-Taiwan**, v. 21, n. 1, p. 105-110, 2013.

YIN, L.-J.; HSU, T.-H.; JIANG, S.-T. Characterization of Acidic Protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 3, p. 662-666, 2013.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **N Biotechnol**, v. 28, n. 2, p. 173-81, 2011.

ZANPHORLIN, L. M. *et al.* . Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2137-2143, 2011.

ANEXOS

Tabela 16. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração.

Tempo (s)	pO ₂ (%)	C _s - C (%)	ln (C _s - C)
0	0	100	4.605
5	0	100	4.605
10	3	97	4.575
15	7	93	4.533
20	11	89	4.489
25	16	84	4.431
30	20	80	4.382
35	22	78	4.357
40	25	75	4.317
45	27	73	4.290
50	28	72	4.277
55	29	71	4.263
60	30	70	4.248
65	30	70	4.248
70	32	68	4.220
75	32	68	4.220
80	32	68	4.220
85	32	68	4.220
90	32	68	4.220
95	32	68	4.220
100	32	68	4.220
105	32	68	4.220
110	32	68	4.220
115	32	68	4.220
120	32	68	4.220

Figura 24. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(C_s - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração.

Tabela 17. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.

Tempo (s)	pO ₂ (%)	C _s - C (%)	ln (C _s - C)
0	0	100	4,605
5	0	100	4,605
10	0	100	4,605
15	0	100	4,605
20	0	100	4,605
25	0	100	4,605
30	0	100	4,605
35	0	100	4,605
40	3	97	4,575
45	5	95	4,554
50	7	93	4,533
55	9	91	4,511
60	12	88	4,477
65	14	86	4,454
70	15	85	4,443
75	17	83	4,419
80	18	82	4,407
85	20	80	4,382
90	21	79	4,369

95	23	77	4,344
100	24	76	4,331
105	26	74	4,304
110	27	73	4,290
115	29	71	4,263
120	30	70	4,248

Figura 25. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln (C_S - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.

Tabela 18. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 200 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração.

Tempo (s)	pO ₂ (%)	C _s - C (%)	ln (C _s - C)
0	0	100	4.605
5	2	98	4.585
10	6	94	4.543
15	9	91	4.511
20	11	89	4.489
25	13	87	4.466
30	15	85	4.443
35	16	84	4.431
40	18	82	4.407
45	19	81	4.394
50	20	80	4.382
55	21	79	4.369

60	22	78	4.357
65	23	77	4.344
70	24	76	4.331
75	24	76	4.331
80	24	76	4.331
85	26	74	4.304
90	26	74	4.304
95	27	73	4.290
100	28	72	4.277
105	28	72	4.277
110	28	72	4.277
115	28	72	4.277
120	29	71	4.263

Figura 26. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(C_s - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,5 vvm de aeração.

Tabela 19. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 100 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.

Tempo (s)	pO ₂ (%)	C _s - C (%)	$\ln(C_s - C)$
0	0	100	4.605
5	2	98	4.585
10	9	91	4.511
15	16	84	4.431
20	21	79	4.369

25	25	75	4.317
30	28	72	4.277
35	30	70	4.248
40	31	69	4.234
45	33	67	4.205
50	34	66	4.190
55	35	65	4.174
60	35	65	4.174
65	37	63	4.143
70	37	63	4.143
75	38	62	4.127
80	39	61	4.111
85	40	60	4.094
90	41	59	4.078
95	44	56	4.025
100	47	53	3.970
105	48	52	3.951
110	49	51	3.932
115	49	51	3.932
120	50	50	3.912

Figura 27. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln (C_S - C)$, em função do tempo para a condição de 200 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.

Tabela 20. Variação da concentração de oxigênio dissolvido em função do tempo, para a condição de 300 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.

Tempo (s)	pO ₂ (%)	C _s - C (%)	ln (C _s - C)
0	0	100	4.605
5	5	95	4.554
10	9	91	4.511
15	10	90	4.500
20	12	88	4.477
25	15	85	4.443
30	17	83	4.419
35	20	80	4.382
40	21	79	4.369
45	23	77	4.344
50	25	75	4.317
55	26	74	4.304
60	28	72	4.277
65	29	71	4.263
70	30	70	4.248
75	32	68	4.220
80	33	67	4.205
85	35	65	4.174
90	36	64	4.159
95	37	63	4.143
100	38	62	4.127
105	40	60	4.094
110	42	58	4.060
115	43	57	4.043
120	44	56	4.025

Figura 28. Logaritmo neperiano da concentração de oxigênio dissolvido na saturação menos a concentração de oxigênio dissolvido, $\ln(Cs - C)$, em função do tempo para a condição de 300 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração.