



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE-
(PPGBAS) - LIKA/UFPE

FELYPE THOMAZ DE BRITO ROCHA

BIOPROSPECÇÃO DE *Aspergillus sp* PRODUTOR DE PROTEASE: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques

Recife-PE

2023

FELYPE THOMAZ DE BRITO ROCHA

**BIOPROSPECÇÃO DE *Aspergillus sp* PRODUTOR DE PROTEASE: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO**

Tese a ser apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Doutor do Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Biologia aplicada à saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Coorientadora: Profa. Dra. Daniela de Araújo Viana Marques

Recife-PE

2023

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Rocha, Felype Thomaz de Brito.

Bioprospecção de *Aspergillus* SP. Produtor de protease: purificação e caracterização. / Felype Thomaz de Brito Rocha – 2023.

113 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia Figueiredo Porto. Coorientadora:
Daniela de Araújo Viana Marques.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências, apêndice e anexos.

1. *Aspergillus* SP. 2. Fermentação em estado sólido. 3. Protease. 4. Resíduo agroindustriais. I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo (Orient.). II. Marques, Daniela de Araújo Viana (Coorient.). III. Título.

FELYPE THOMAZ DE BRITO ROCHA

**BIOPROSPECÇÃO DE *Aspergillus sp* PRODUTOR DE PROTEASE: PURIFICAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biologia Aplicada à Saúde da Universidade Federal de
Pernambuco, Centro Acadêmico de Biociências, como
requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia
Aplicada à Saúde. Área de concentração: Biologia
Aplicada à Saúde.

Aprovado em: 31/01/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^o. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa (Examinador Interno)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcante Vieira Soares (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra (Examinador Externo)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Carolina de Albuquerque Lima Duarte (Examinador Externo)
Universidade de Pernambuco

Dedico esta Tese a minha mãe. Sua grande força e garra permitiram-me avançar durante todo caminho árduo, sempre com palavras de incentivo e força, fazendo-me superar os meus limites e as dificuldades encontradas. Mãe meus sinceros agradecimentos.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora Prof. Dr^a. Ana Lucia Figueiredo Porto pela sua orientação, respeito, disponibilidade, confiança e o acolhimento dentro do LABTECBIO desde minha graduação, agradeço pelo estímulo e ensinamento. Meus sinceros agradecimentos e admiração.

Agradeço ao Prof. Dr. Romero Brandão e a Prof^a Daniela Marques que disponibilizaram o seu tempo para me coorientar, pelos seus ensinamentos, estímulos e conselhos nas horas difíceis, por estimular o correr atrás de soluções promovendo o crescimento científico. Agradeço a todos os amigos do LABTECBIO, sem essa grande família nada do que foi realizado nesse trabalho teria sido possível, aprendi e cresci muito na presença de todos vocês.

Agradeço a minha esposa por sempre acreditar que seria possível, por estimular a correr atrás dos meus sonhos, sempre levantando o meu espírito nas horas difíceis que a vida impõe.

Agradeço ao Pai celestial por se fazer presente na minha vida e conceder forças necessárias para chegar até esse dia. Obrigado!

Agradeço a FACEPE e CAPES pela bolsa e pelo financiamento da pesquisa.

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar as possibilidades para a sua própria produção ou a sua construção.”

Paulo Freire

Resumo

As proteases desempenham um papel significativo na biotecnologia devido à sua capacidade de catalisar a clivagem de ligações peptídicas em proteínas. Esse papel é explorado em várias aplicações biotecnológicas, como por exemplo na produção de proteínas recombinantes, biotecnologia alimentar, produção de peptídeos, biotecnologia farmacêutica e degradação de resíduos orgânicos. O presente trabalho teve como objetivo utilizar fungos do gênero *Aspergillus* (*A. sydowii* e o *A. serratalhadensis*) para a produção de proteases utilizando o resíduo de café como fonte de substrato. Planejamento fatorial 2^3 (temperatura 25 e 30°C; umidade 40% e 60%; e glicose) foi utilizado para o processo fermentativo associado à técnica de purificação em colunas cromatográficas. Os resultados da fermentação com o *A. sydowii* demonstraram que o extrato bruto apresentou atividade proteolítica de 412 U/mL, sendo inibida por PMSF (85%), e ativada pelo íon Fe^{+3} . A atividade ótima foi observada em pH 8 a 45°C, com estabilidade térmica até 45°C. O protocolo de purificação apresentou uma protease com massa molecular ~48KDa, fator de purificação 5,9 vezes, recuperação de 53% e a atividade proteolítica de 256 U/mL. A atividade ótima foi observada em pH 8,0 a 45°C, com estabilidade da enzima entre 35°C e 50°C, mantendo 70% de sua atividade inicial. No entanto, para o *A. serratalhadensis* o EB apresentou uma atividade proteolítica acima 1066 U/mL, sendo inibida pelo íon Zn^{+2} (49,5%), diferente dos íons Na^{+} e K^{+} que aumentaram a atividade em 11,9% e 19,1%, respectivamente. A atividade ótima foi encontrada em pH 6 a 35°C, com estabilidade térmica do extrato entre 25°C e 55°C. As linhagens distintas de *A. sydowii* e *A. serratalhadensis* demonstraram eficácia na síntese de proteases com potencial biotecnológico por meio da Fermentação em Estado Sólido (FES), ao empregar borra de café como substrato. Esse processo contribui para a redução do impacto ambiental, pois permite a reutilização de resíduos.

Palavras-chave: *Aspergillus* sp., Fermentação em estado sólido, protease, resíduos agroindustriais

Abstract

Proteases play a significant role in biotechnology due to their ability to catalyze the cleavage of peptide bonds in proteins. This role is explored in several biotechnological applications, such as the production of recombinant proteins, food biotechnology, peptide production, pharmaceutical biotechnology and degradation of organic waste. The present work aimed to use fungi of the genus *Aspergillus* (*A. sydowii* and *A. serratalhadensis*) for the production of proteases using coffee residue as a source of substrate. Factorial design 2³ (temperature 25 and 30°C; humidity 40% and 60%; and glucose) was used for the fermentation process associated with the purification technique in chromatographic columns. The results of fermentation with *A. sydowii* demonstrated that the crude extract presented a proteolytic activity of 412 U/mL, being inhibited by PMSF (85%), and activated by the Fe⁺³ ions. Optimal activity was observed at pH 8 at 45°C, with thermal stability up to 45°C. The purification protocol presented a protease with a molecular mass of ~48KDa, a purification factor of 5.9 times, recovery of 53% and a proteolytic activity of 256 U/mL. The optimal activity was observed at pH 8.0 at 45°C, with enzyme stability between 35°C and 50°C, maintaining 70% of its initial activity. However, for *A. serratalhadensis*, EB showed a proteolytic activity above 1066 U/mL, being inhibited by the Zn⁺² ion (49.5%), different from the Na⁺ and K⁺ ions, which increased the activity by 11.9% and 19.1%, respectively. The optimum activity was found at pH 6 at 35°C, with thermal stability of the extract between 25°C and 55°C. Different strains of *A. sydowii* and *A. serratalhadensis* demonstrated efficacy in the synthesis of proteases with biotechnological potential through Solid State Fermentation (FES), using coffee grounds as a substrate. This process contributes to reducing environmental impact, as it allows the reuse of waste.

Keywords: *Aspergillus* sp., Solid state fermentation, protease, agro-industrial waste

Lista de Abreviaturas

ABIC: Associação brasileira da indústria de café

BDA: Agar Batata Dextrose

BOD: Câmara de Germinação

Conab: Companhia Nacional de Abastecimento

DEAE SEPHADEX: Dietilaminoetil Sephadex

DFP: Disopropil fluorofosfato

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA: Ácido tetra-acético etileno glicol

FES: Fermentação em Estado Sólido

FPLC: Cromatografia Líquida de Proteína Rápida

HCl: ácido clorídrico

HPLC: Cromatografia Líquida de Alto Desempenho

M: Molaridade

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonila

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil- sulfato de sódio

TCA: ácido tricloroacético

TEMED: N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina

TIMP: Inibidores proteico tecidual

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

Listas de Figuras e Tabelas

Capítulo 1:

Tabela 1: Microrganismos do gênero *Aspergillus* produtores de protease e os resíduos agropecuários utilizados na fermentação

Tabela 2: Microrganismos do gênero *Aspergillus* produtores de proteases e os resíduos agropecuários utilizados na fermentação.

Figura 1: Estrutura microscópica do *Aspergillus sydowii*.

Figura 2: Análise dos maiores produtores de *Coffea arabica* (café arábica) (A) e *Coffea canephora* (café robusta) (B) na safra de 2020/21.

Capítulo 2:

Figure 1: Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica DEAE-Sephadex. As marcas mostram as frações contendo a atividade de protease.

Figure 2: Perfil de eluição do sistema Superdex 75 FPLC. a) Primeira corrida: Cromatograma contendo picos variados de proteína com o pico da protease apontado. b) Segunda corrida: Fração isolada contendo o pico de protease encontrado em a).

Figure 3: Imagem SDS-PAGE (10%) da enzima produzida e purificada de *Aspergillus sydowii* pelo sistema FPLC. (A) Marcadores moleculares; (B) Enzima purificada sob condições redutoras na presença de DTT; (C) Enzima purificada sob condições redutoras na presença de β-mercapto etanol; (D) Enzima purificada sob condições não redutoras. As proteínas padrões (×) usadas para calcular a regressão linear: ribonuclease A (13,7kDa), anidrase carbônica (29kDa), ovalbumina (43kDa), conalbumina (75kDa), aldolase (158kDa), ferritina (440kDa) e tireoglobulina (669kDa). A massa molecular da enzima purificada foi calculada a partir da curva padrão.

Figure 4: Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade de proteases. Os ensaios de protease foram realizados utilizando protease purificada (0,75 µg).

Figure 5: Efeito do pH ideal para a atividade da protease. pH ótimo (a) e estabilidade de pH (b) dos extratos brutos e purificados. Os ensaios de protease foram realizados utilizando protease purificada (0,75 µg).

Figure 6: Temperatura ótima (a) e estabilidade térmica (b) dos extratos bruto e purificado. Os ensaios de protease foram realizados utilizando protease purificada (0,75 µg).

Figure 7: Perfil cromatograma de HPLC do processo de degradação da azocaseína usando uma protease purificada de *A. sydowii*. (A) Perfil de HPLC de Azocaseína adquirida da Sigma; (B) Perfil HPLC da hidrólise da Azocaseína utilizando uma protease purificada através dos parâmetros ótimos.

Capítulo 3:

Figura 1: Sequência do processo de purificação da protease

Figura 2: Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica DEAE-Sephadex.

Figura 3: Perfil de eluição do sistema Superdex 75 FPLC

Figura 4: Efeitos de íons metálicos

Figura 5: Curva do pH ótimo (A) e estabilidade (B) após 1h da protease purificada de *Aspergillus serratalhadensis*

Figura 6: Curva de temperatura ótima (A) e estabilidade de temperatura (B) após 1h da protease purificada de *Aspergillus serratalhadensis*.

Sumário

1.0	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	Objetivos gerais	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
2.0	CAPÍTULO 1: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	USO DE RESÍDUO AGROPECUÁRIO PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE	16
2.2	INDÚSTRIAS CAFEEIRAS E SEUS RESÍDUOS	17
2.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	20
2.4	PROTEASES PRODUZIDAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS	22
2.5	PROTEASES E SUA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA	29
2.6	TÉCNICAS DE ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	30
2.6.1	TÉCNICAS DE ISOLAMENTO	30
2.6.2	MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO	32
2.6.2.1	TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	32
2.6.3	CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	34
2.7	REFERÊNCIAS	37
3.0	CAPÍTULO 2: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PROTEASE FROM <i>ASPERGILLUS SYDOWII</i> URM 5774: COFFEE GROUND RESIDUE FOR PROTEASE PRODUCTION BY SOLID STATE FERMENTATION	46
4.0	CAPÍTULO 3: PRODUCTION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASE PRODUCED BY A NEW <i>ASPERGILLUS</i> SPECIE THROUGH SOLID-STATE FERMENTATION	47
4.1.	INTRODUÇÃO	49

4.2	METODOLOGIA	50
4.2.1	Materiais	50
4.2.2	Microrganismo	50
4.2.3	Fermentação em Estado Sólido e extração da enzima	51
4.2.4	Determinação de atividade proteolítica e dosagem de proteína	51
4.2.5	Precipitação com solvente orgânico	52
4.2.6	Métodos cromatográficos	52
4.2.7	Caracterização Bioquímica	52
4.2.7.1	Efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica da protease purificada	52
4.2.7.2	Determinação da termoestabilidade ao pH e à temperatura	52
4.2.7.3	Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica	53
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.3.1	Produção da enzima por FES	53
4.3.2	Purificação da Enzima	56
4.3.3	Efeitos de inibidores e metais na atividade de protease	62
4.3.4	Efeitos da temperatura e do pH na atividade e estabilidade	64
4.4	CONCLUSÃO	67
4.5	REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES A - Purification and characterization of a thermostable protease from <i>Aspergillus sydowii</i> : Coffee ground residue as an excellent substrate for protease production by solid state fermentation		75
APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO EM ANAIS		97
APÊNDICE C – CAPITULO DE LIVRO		97
APÊNDICE D - RESUMO EXPANDIDO		98
APÊNDICE E - PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS CIENTÍFICOS		103
Anexos I – Regras para publicação da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.		108

1.0 Introdução

As proteases estão presentes em todas as formas de vida, pois estão envolvidos em processos biológicos essenciais (Bi et al., 2011; Gupta, Beg, Lorenz, 2002) devido a isso sua grande importância para a indústria e representam 60% de todas as enzimas comercializadas (Albuquerque et al.2020). O mercado global de aplicação de enzimas industriais deve chegar a US \$ 8,7 bilhões até 2026, a uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 6,3% para o período de 2021-2026 (BBC RESEARCH, 2022).

Para atender essa demanda diversas fontes vêm sendo explorada como, plantas, animais e microrganismo tendo um destaque para os fungos filamentosos e as bactérias. Dentre o grupo de fungos filamentosos o gênero *Aspergillus* ganham destaque por produzirem enzimas com ampla faixa de pH e por se adaptarem em diversos substratos diferentes mantendo uma alta produção enzimática (Vishwanatha; Rao; Singh, 2010; Hernández-Martínez et al., 2011) e devido a sua adaptabilidade em diversos ambientes (Gibbons; Rokas, 2013).

A obtenção de proteases ocorre de diversas formas, sendo a de origem microbiana a mais utilizada, com isso, os resíduos provenientes da agroindústria que possuem baixo valor agregado, mas, ricos em fontes de carbono e nitrogênio, podem ser utilizadas como substrato no processo fermentativo. A FES apresenta vantagens em relação à fermentação submersa (FSm), essas vantagens são divididas em grupos como: 1) Ausência de água livre (diminuição de contaminações bacterianas e menor custo de tratamento de efluente líquidos) , 2) Meio de fermentação (baixo custo e suplemento mineral mínimo), 3) Ambiente natural (assemelha ao ambiente natural do fungo), 4) Produtividade volumétrica (maior produtividade), 5) Processamento à jusante (produto altamente concentrado), 6) Aspectos do meio ambiente (gestão de resíduos e controle de poluição) e 7) Qualidade do meio ambiente (produtos resistente ao calor e ao pH). Em relação às desvantagens da FSm destacam-se a alta atividade de água tornando mais suscetível à contaminação bacteriana, alto custo para tratamento de efluentes líquidos, a utilização de produtos químicos de grau analítico altamente purificado, baixa produtividade volumétrica, alto custo para concentração e purificação das enzimas (Elgui, 2019).

As enzimas podem ser utilizadas em diversos setores da indústria como: têxtil, de limpeza, de alimentos, farmacêutica. (Zimmer et al., 2009), além disso podem ser usadas em processos de regulação de proteínas, (Bi et al., 2011), na recuperação de prata de filmes fotográficos e de raio X, em diagnósticos, tratamento médico (Schuster et al., 2019) e na síntese de peptídeos (Shankar et al, 2011).

Diante do exposto, o uso de proteases produzidas a partir de microrganismos, utilizando um resíduo agroindustrial e através de uma metodologia simples de fermentação, torna o processo de produção viável, econômico e ecologicamente correto para produção.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos Gerais

- Produzir proteases obtidas de fungos do gênero *Aspergillus* (*A. sydowii* e o *A. serratalhadensis*) através da técnica de fermentação em estado sólido (FES), utilizando o resíduo de café, e em seguida purificá-las e determinar as suas características físico-químicas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a produção de protease pelos fungos *A. sydowii* e *A. serratalhadensis* utilizando o resíduo de café;
- Avaliar as melhores condições para produção de proteases pela fermentação em estado sólido (FES);
- Determinar as condições e a técnica de cromatografia mais adequada para a purificação das proteases obtidas no processo de Fermentação estado sólido utilizando os fungos *A. sydowii* e *A. serratalhadensis*;
- Caracterizar bioquimicamente os extratos brutos e as enzimas purificadas quanto ao pH e temperatura ótima, estabilidade ao pH e temperatura, substratos específicos, inibidores e efeito de íons;

2.0 Capítulo 1: Revisão Bibliográfica

2.1 Uso de resíduo agropecuário para produção de protease

A utilização de resíduos agropecuários ricos em proteínas visando à produção de protease extracelular por microrganismo é uma prática que resulta no aumento da produção. Isso ocorre devido à necessidade do fungo têm de obtenção de nitrogênio e carbono para seus processos biológicos estimulando a produção de enzimas extracelular para promover a quebra do nitrogênio e do carbono (Schuster, et al., 2019).

Tabela 2: Microrganismos do gênero *Aspergillus* produtores de proteases e os resíduos agropecuários utilizados no processo fermentativo.

Microrganismo	Substrato	Referência
<i>A. sidowii</i>	Café	Rocha et al., 2021
<i>A. ochraceus</i>	Farelo de Trigo	Zhu et al., 2021
<i>A. heteromorphus</i>	Farelo de trigo	Fernandes et al., 2020
<i>A. brasiliensis</i>	Leite	Schuster, et al., 2019
	Hemácias de Suíno	
<i>A. rhizopodus</i>	Leite	Schuster, et al., 2019
	Hemácias de Suíno	
	Plasma Suíno	
<i>A. níger</i>	Leite	Schuster, et al., 2019
	Hemácias de Suíno	
	Farelo de trigo	Castro et. al., 2015
	Farelo de soja	
	Farelo de algodão	
	Casca de Laranja	
<i>A. giganteus</i>	Leite	Schuster, et al., 2019
<i>A. parasiticus</i>	Leite	Schuster, et al., 2019
	Hemácias de Suíno	
	Farelo de trigo	Tunga et al., 2003
<i>A. tamarii</i>	Farelo de trigo	Silva et al., 2018)

<i>A. oryzae</i>	Soro de Leite	Belmessikn et al., 2013
	Farelo de trigo	Kumura, Ishido e Shimazaki, 2011
	Farelo de Arroz	Vishwanatha et al., 2009
	Bagaço de Tomateiro	Chutmanop et al., 2008
<i>A. terreus</i>	Efluente de óleo de Palma pré filtrado	Wu et al., 2006
<i>A. fumigatus</i>	Pó da casca de camarão	Wang et al., 2004

A produção industrial dessas enzimas fúngicas vem aumentando e apresentando resultados do que na produção bacteriana, diante da grande variedade e aplicações (Schuster, et al., 2019; Siala et al., 2012), contudo, ainda é fundamental o aprimoramento, visando reduzir custos e otimizar a produção selecionando meios de cultura e microrganismos mais eficientes (Schuster, et al., 2019). Muitas espécies de fungos são estudadas em paralelo com novos resíduos como mostra a Tabela 2.

Diversos parâmetros devem ser analisados para a escolha do processo fermentativo como o tipo de resíduo, a natureza física e a biomolécula desejada (Yadav et al., 2015).

Diante do exposto podemos verificar que a utilização de resíduos para produção enzimática é uma prática consolidada, entretanto faz necessário novas fontes de substratos que venha a atender as necessidades de produção assim como a demanda por uma produção com menos impactos ambientais. Com isso o resíduo de café vem para atender tanto a necessidade nutricional do fungo produtor como também a redução do impacto ambiental causado pela eliminação desses resíduos no ambiente.

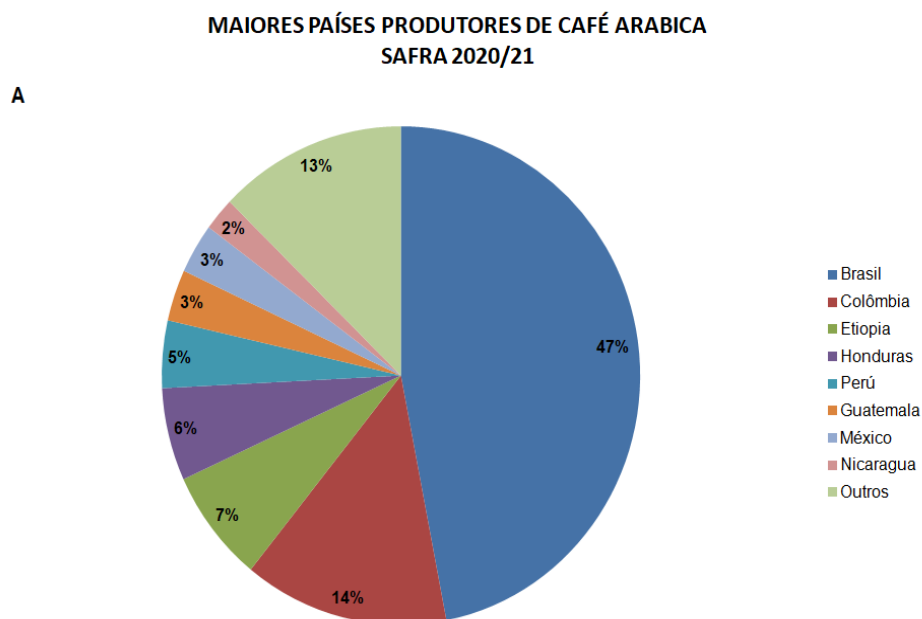
2.2 Indústrias cafeeiras e seus resíduos

A indústria cafeeira é um setor econômico que engloba todas as atividades relacionadas ao cultivo, processamento, comercialização e consumo de café. O café é a segunda bebida mais consumida mundialmente e que agrada o paladar de milhões de pessoas. Entre as *commodities* comercializadas no mundo, o café ocupa uma posição privilegiado sendo o segundo produto mais vendido no mundo, perdendo apenas para o petróleo (Kang et al 2022; Butt & Sultan, 2011).

Essa popularidade é devido a grande variedade de sabores e aromas possíveis de desfrutar, além disso, a qualidade da bebida vem sendo cada vez mais importante. Essas qualidades estão ligadas às regiões de cultivo, as técnicas de cultivo e processos pós-colheita (Pereira et al., 2015). Seus efeitos fisiológicos, psicológicos e nutricionais são outro fator importante para sua popularização (Haile e Kang 2019).

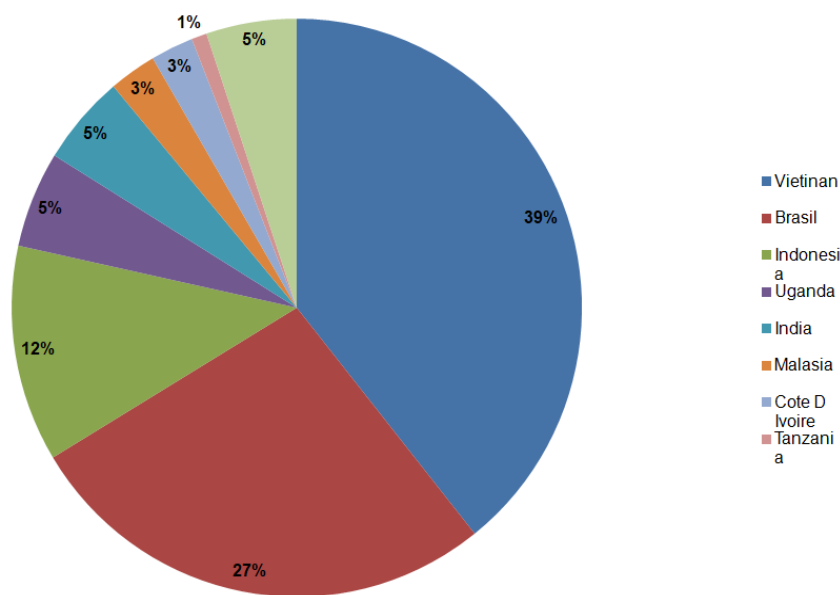
Segundo a Companhia de abastecimento (Conab) o Brasil é o principal produtor e exportador de *Coffea arabica* seguido pela Colômbia, Etiópia e Honduras. Já em relação ao *Coffea canephora* o Brasil ocupa a segundo lugar na produção Figura 2.

Figura 2: Análise dos maiores produtores de *Coffea arabica* (café arábica) (A) e *Coffea canephora* (café robusta) (B) na safra de 2020/21.



**MAIORES PAÍSES PRODUTORES DE CAFÉ ROBUSTA
SAFRA 2020/21**

B



Fonte: Adaptado da Análise mensal Junho/Julho 2022 da Conab, 2022.

Para muitos países, o café é uma importante plantação e que continua a crescer. No ano 2019/2020, o consumo de café teve um aumento de 0,5% chegando a ser consumida aproximadamente 166,06 milhões de sacas de café (Mahingsapun et al 2022, APUD Organização Internacional do Café, 2020).

Segundo a Associação brasileira da indústria de café (ABIC) em 2021, o Brasil teve uma produção que ultrapassou 60 milhões de sacas sendo aproximadamente 48 milhões de Arábica e 14 milhões de robusta e em 2022 chegou a 53 milhões de sacas sendo aproximadamente 35 milhões de arábica e 17 milhões de robusta. O consumo interno no Brasil ultrapassou 21 milhões de sacas no ano de 2022. Em 2020/2021, o consumo interno de café teve um aumento de 1,7% em relação ao ano anterior tendo um consumo per-capito de grão cru de 6,06 (Kg/hab.ano) e de café torrado e moído de 4,84 (Kg/hab.ano) tendo um aumento de 1,06% para ambos os consumos (ABIC 2022).

De acordo com Rocha, 2018, no Brasil, em 2015 foram produzidos nas residências brasileiras cerca de aproximadamente 978.000 toneladas de resíduo de café que são eliminados em sua grande maioria nos ralos da pia e acabam causando danos ambientais. Em 2020/2021 podemos verificar que a geração de resíduos produzidos pela preparação do café chegou a 1.040.600 t sendo que aproximadamente 64% desse consumo ocorrem nas residências (ABIC 2022).

O uso de resíduos orgânicos da agropecuária como fonte de nutrientes para o processo fermentativo possui um importante papel na redução de custos nos processos fermentativos (Schuster, et al., 2019), pois são de baixo custo e com alta disponibilidade (Murthy e Kusumoto, 2015). Diversos subprodutos ou resíduos da cadeia produtiva ou do consumo de algum produto agropecuário podem ser utilizados como fonte de obtenção de nutrientes para o processo fermentativo como: casca de frutas, farelo de trigo, de soja e de arroz (Cordoso et al., 2022), borra de café (Rocha et al., 2021), soro de leite (Kumaru, Ishido e Shimazaki, 2011), pó de casca de camarão e caranguejo (Wang et al., 2004).

O Brasil sendo um dos maiores produtores e consumidores de café do mundo (ABIC, 2022) não está isento da geração desses resíduos que podem ocasionar diversos danos ambientais. Segundo Yafetto (2022) a fermentação em estado sólido conquistou reconhecimento mundial ao longo das décadas devido ao seu potencial para desempenhar um papel significativo na abordagem de desafios globais persistentes, como a desnutrição em humanos e animais, a poluição ambiental, as mudanças climáticas, a fome e o aprimoramento da segurança alimentar em escala global.

2.3 Fermentação em Estado Sólido

A fermentação no estado sólido envolve uma série de etapas que são caracterizadas em processos *upstream*, *midstream* e *downstream* (Mitchell et al., 2000; Ashok et al., 2017) esse processo de fermentação reutiliza e/ou recicla os resíduos, como os provenientes da agroindústria. Esses resíduos agropecuários possuem um grande valor como substrato, pois possuem características como baixo valor agregado, fácil disponibilidade e são reprodutíveis (Murthy e Kusumoto, 2015), além de também

serem utilizados outros tipos de resíduos orgânicos como casca de fruta, farelo de trigo, soja e arroz (Cordoso et al., 2022) e borra de café (Rocha et al., 2021).

A FES por utilizar um volume menor de água produz um líquido fermentado mais concentrado, com isso ocorre à redução dos custos e do tempo na recuperação das enzimas proteolíticas (Schuster et. al., 2019), além disso, a baixa disponibilidade de água no sistema reduz a probabilidade de contaminação bacteriana e favorece o crescimento de fungos filamentosos, que já crescem facilmente sobre substratos sólidos (Cardoso et al., 2022; Chilakamarry et al., 2022).

A técnica de fermentação em estado sólido (FES) é um processo fermentativo produtor de uma grande variedade de biomoléculas, entre essas, as enzimas proteolíticas (Ravikumar et al., 2012).

A aplicação da fermentação em estado sólido beneficia principalmente os setores alimentício, farmacêutico, energético e químico em todo o mundo, pois, por meio da utilização conveniente da biotecnologia microbiana, ela é empregada na produção de alimentos fermentados e outros produtos industriais valiosos (Couto e Sanrom an, 2006; Ghosh, 2016).

A fermentação em estado sólido (FES) apresenta vantagens significativas na produção de enzimas por fungos filamentosos. Do ponto de vista ambiental, destaca-se por sua capacidade de utilizar resíduos agroindustriais como sólidos substratos, que atuam como fontes de carbono e energia (Yafetto 2022), pois se assemelham as condições do ambiente natural resultando em uma adaptação, crescimento e produção enzimática mais eficiente. Além disso, a concentração dos produtos após a extração é consideravelmente superior em comparação com o processo de fermentação submersa, e, conseqüentemente, gera menos resíduos líquidos. Essa abordagem desperta um interesse econômico significativo em áreas onde há uma abundância de biomassa e resíduos agroindustriais, os quais representam fontes de materiais baratos e abundantes (Santos et.al,2008).

No processo de FES diversos fatores devem ser analisados para que ocorra uma boa produção de protease entre esses fatores podem ser destacados a seleção do microrganismo a ser utilizada, a escolha do substrato adequado a ser usada de acordo com o objetivo da produção, a concentração de nitrogênio, carbono e outros

nutrientes além da quantidade de oxigênio disponível durante o processo fermentativo, a disponibilidade de água, a umidade, temperatura e pH. Todas essas condições afetam tanto crescimento do microrganismo como a produção das biomoléculas (Singhania et al., 2009). Ao término do processo fermentativo com as condições otimizadas, inicia-se o isolamento e purificação da molécula alvo.

2.4 Proteases produzidas por fungos filamentosos

As proteases são produzidas amplamente por vários organismos como, bactérias, fungos, animais e plantas (Arokiyaraj et al., 2015, Balachandran et al., 2015, Al-Dhabi et al., 2019). Processos para obtenção de proteases derivadas das plantas é um processo mais lento, pois dependem do desenvolvimento do cultivo. Esse período de cultivo faz parte da fisiologia natural, além disso, o processo de produção também pode ser afetado por estresse bióticos e abióticos ao longo do desenvolvimento vegetal o que dificulta para um processo visando campo industrial (Rao et al., 1998).

As proteases de origem animal enfrentam o mesmo problema em relação ao tempo necessário para a produção dessas enzimas, pois muitas enzimas como pepsina, quimiosina e tripsina dependem do abate dos animais.

Por outro lado, às enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos são mais confiáveis para oferta de mercado devido a serem mais rentáveis, possuírem uma maior diversidade bioquímica e uma produção mais rápida e estável apresentando, portanto, maior potencial para a indústria (Mansor et al. 2019).

A crescente demanda por enzimas com propriedades específicas tem levado a intensa busca por novas fontes de proteases (Bi et al., 2011). As proteases microbianas vêm com o objetivo de suprir essa demanda e está entre as principais fontes de enzimas comercializadas em processos biotecnológicos (Rocha et al., 2021; Murthy e Kusumoto, 2015) elas representam 60% das enzimas comerciais utilizadas pela indústria (Albuquerque et al.2020; Silva, Almeida, Melo e Porto, 2018).

Entre os fungos filamentosos podemos destacar o gênero *Aspergillus*, na literatura esse grupo é conhecido como excelentes produtores de enzimas, principalmente com atividade proteolítica, além de metabólicos secundários com

diversas aplicações em processos industriais e farmacêuticos (Vishwanatha; Rao; Singh, 2010; Hernández-Martínez et al., 2011).

O gênero *Aspergillus* pertence à Família Trichocomaceae, Ordem Eurotiales, Classe Eurotiomycetes e Filo Ascomycota (Hubka et al., 2013). Dentro do grupo de fungos filamentosos, esse gênero tem um destaque importante devido a sua distribuição cosmopolita que mostra a grande capacidade adaptativa em diversos ambiente além de o seu hábito alimentar detritívoro que proporciona facilidade para se adaptar a diversos substratos sólidos (Gibbons; Rokas, 2013). Na Tabela 1 é possível verificar a amplitude de habitat do gênero *Aspergillus*.

O *A. serratalhadensis* (Fig.01) foi relatado à primeira vez na literatura por Oliveira, 2018 encontrado no solo da Caatinga é uma espécie que apresenta colônia no espectro de cor entre o marrom escuro e o preto.

Figura 1: Estrutura microscópica do *Aspergillus sydowii*.



Fonte: O Autor.

Já o *A. sydowii* (Fig. 02) pertence à Seção Versicolores e está mundialmente distribuída na natureza. No entanto, devido à sua preferência por ambientes xerofílicos, tem sido pouco abordado em pesquisas. Os locais mais comuns para encontrar fungos da Seção Versicolores incluem solos, material vegetal em decomposição e grãos armazenados (Chalfoun, 2003).

Figura 2: Estrutura macroscópica e microscópica do *Aspergillus serratalhadensis* URM 7866 (Oliveira et al., 2018)



Tabela 1: Diferentes fontes de isolamento do gênero *Aspergillus*.

Microrganismo	Fonte de Isolamento	Referência
<i>Aspergillus terreus</i>	Solo do manguezal	Eldin et al., 2022
	Solo em torno da indústria de couro	Chellapandi, 2010
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ambiente hospitalar	Cardoso et al., 2022
	Manguezal	Xu et al., 2020
	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus nNíger</i>	Ambiente hospitalar	Cardoso et al., 2022
	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus flavus</i>	Ambiente hospitalar	Cardoso et al., 2022
	Frutos secos de tâmara	Quaglia et al., 2020
	Solo em torno da indústria de couro	Chellapandi, 2010
	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus chevalieri</i>	Mar	Ertekin et al., 2022
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Rejeitos de mina de bauxita	Anusha et al., 2021
<i>Aspergillus ustus</i>	Animal marinho	Li et al., 2021
	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus sydowii</i>	Fundo do Mar	Niu et al., 2020

<i>Aspergillus sp.</i>	Molusco bivalve marinho	An et al., 2020
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Frutos secos de tâmara	Quaglia et al., 2020
<i>Aspergillus versicolor</i>	Mar Solo da Caatinga	Zhanh et al., 2019 Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus candidus</i>	Mar	Li et al., 2019
<i>Aspergillus arcuoverdensis</i>	Solo da Caatinga	Matsuzawa et al, 2015
<i>Aspergillus caatingaensis</i>	Solo da Caatinga	Matsuzawa et al, 2014
<i>Aspergillus pernambucoensis.</i>	Solo da Caatinga	Matsuzawa et al, 2014
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013

<i>Aspergillus brevipes</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus duricaulis</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus japonicus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus niveus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus ochraceus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus ostianus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013

<i>Aspergillus puniceus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
-----------------------------	------------------	-----------------------

<i>Aspergillus tamarii</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
----------------------------	------------------	-----------------------

<i>Aspergillus terreus</i>	Solo da Caatinga	Oliveira et al., 2013
----------------------------	------------------	-----------------------

<i>Aspergillus clavatus</i>	Águas residuais	Hajji, Kanoun, Nasri e Gharsallah, 2007
-----------------------------	-----------------	---

As condições ambientais e nutricionais exercem influência no crescimento e desenvolvimento do microrganismo e consequentemente na produção de metabólitos microbianos, incluindo as proteases. Os parâmetros mais importantes na etapa de produção dessas enzimas são: o substrato, tempo de produção, temperatura e pH (Chimbekujwo, Ja'Afaru e Adeyemo, 2020). O substrato para produção de enzimas proteolíticas necessita ter a disponibilidade de nitrogênio e carbono, pois ambos possuem efeito regulatório na síntese de protease por diversos microrganismos, inclusive os fungos filamentosos que absorvem e utilizam o nitrogênio para obter energia para seu desenvolvimento (Schuster, et al., 2019; Belmessikh et al., 2013; Hajji et al., 2008).

Muitos microrganismos (incluindo fungos filamentosos) assimilam, absorvem ou utilizam nitrogênio orgânico de aminas para obter energia e para seu desenvolvimento. As aminas têm seus aminoácidos ligados por ligações peptídicas ou pequenos peptídeos, polipeptídeos e proteínas. Por outro lado, proteínas e peptídeos, podem ser hidrolisados em aminoácidos e utilizados como fontes de nitrogênio para microrganismos em processos biotecnológicos. Algumas fontes complexas e convencionalmente usadas na fermentação são extrato de levedura, hidrolisado de plantas ricas em proteínas, vegetais, resíduos de alimentos, subprodutos de carne, tecidos animais e fluidos corporais, resíduos de peixe, penas, permeado de soro e extrato de grama. A hidrólise desses materiais ricos em proteínas pode ser catalisada por proteases extracelulares excretadas por microrganismos no meio ou por sua hidrólise prévia (Pleissner e Venus, 2016).

2.5 Proteases e sua aplicação na indústria

Proteases são enzimas que catalisam a quebra de proteínas por hidrólise das ligações peptídicas (Bi et al., 2011; Gupta, Beg, Lorenz, 2002), sua atividade resulta na geração de monômeros proteicos, aminoácidos entre outros (Chimbekujwo, Ja'Afaru e Adeyemo, 2020). As proteases ganharam espaço entre as diversas classes de enzimas devido ao alto valor econômico agregado e associado a isso, a sua importância biotecnológica devido à diversidade estrutural e de mecanismos de ação (Giongo, 2006).

As enzimas proteolíticas têm grande potencial e são frequentemente exploradas para vários processos industriais. Essas proteínas têm sido amplamente utilizadas em couro, detergentes, panificação, laticínios e indústrias farmacêuticas (Al-Dhabi et al., 2019), na regulação do processamento de proteínas, remoção de proteínas anormais ou danificadas da célula, além do desenvolvimento, a fisiologia, a defesa e resposta ao estresse (Bi et al., 2011; Gupta, Beg, Lorenz, 2002), no tratamento de resíduos, em compostos bioativos, na recuperação de prata de filmes fotográficos e de raio X, em diagnósticos, tratamento médico e de lesões e no tratamento de intolerância proteica (Schuster et al., 2019), síntese de peptídeos, preparação de hidrolisados proteicos e em ferramentas de análise em pesquisa básica (Shankar et al, 2011; Agrebi et al., 2010). As proteases mostram tolerância a muitas alterações ou mudanças abióticas, como alta temperatura, pH e salinidade (Al-Dhabi et al., 2019). Na indústria farmacêutica as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas. As queratinases, que possuem como substrato a queratina, são úteis na remoção de queratina no tratamento de acne ou psoríase, na remoção de calosidade humana e degradação de pele queratinizada e no tratamento de micoses por fungos dermatófitos (Bon; Vermelho, 2004; Brandelli, Daroit e Riffel, 2010).

Essas ainda podem ser aplicadas clinicamente no tratamento de doenças, assim como a Doença Celíaca ou enteropatia sensível ao glúten (Shan. et. al. 2004). Outro exemplo são as collagenases, as quais são utilizadas na remoção de queloides, no tratamento de úlceras e de queimaduras (Sukhosyrova et al. 2003). Por fim, temos também outro grupo de enzimas, as fibrinolíticas, que possuem a capacidade de degradar a fibrina, que é o principal componente proteico dos coágulos sanguíneos formados a partir da ativação do fibrinogênio pela trombina (Nascimento et al., 2015).

2.6 Técnicas de isolamento, purificação e caracterização de proteínas

2.6.1 Técnicas de isolamento

O isolamento de biomoléculas produzidas por fungos inicia-se com a separação do líquido fermentado do substrato, essa separação ocorre utilizando diversas soluções, onde serão extraídos compostos com maiores afinidades às soluções utilizadas. A purificação de proteases fúngicas vem sendo purificada principalmente por

métodos convencionais que estão baseados em aspectos moleculares gerais como: carga elétrica, tamanho molecular, solubilidade e hidrofobicidade (REF).

Essa separação inicial na biotecnologia ocorre principalmente pelo uso de precipitação salina (Silva et al., 2009), cromatografia de afinidade e gel filtração (Takahashi, 2008), cromatografia de troca iônica (Watanabe et al., 2008), cromatografia de fase reversa (Rodrigues-Nogales et al., 2010), entre outros.

Devido à grande necessidade e o aumento no processo de purificação de proteínas, o químico Arthur B. Little propôs, em 1917, uma esquematização e definiu o processo em quatro etapas: 1) clarificação ou remoção de compostos insolúveis, 2) isolamento do produto ou concentração, 3) purificação intermediária e 4) polimento (Zuñiga 2003). Com isso, foram desenvolvidas diversas técnicas de purificação para atender as etapas da purificação propostas, promovendo assim uma melhor purificação da biomolécula alvo (Tabela 3).

Tabela 3: Técnicas de purificação

ETAPAS DE PURIFICAÇÃO					
Técnica de isolamento/separação	Clarificação	Concentração ou Isolamento	Purificação intermediária	Purificação Final	Autores
Filtração	●	×	×	×	Teotia, 2001
Centrifugação	●	×	×	×	Niven, 2003 Westfalia, 2001 Aruna; John & Thakrar, 2000
Precipitação	●	×	×	×	Teotia, 2001 Chisti, 1998 Glatz 1998
Sistema aquoso	●	●	●	●	Fernandes, 2020

Bifásico					Giraldo-Zuñiga, Coimbra & Minim, 2001
Cromatografia (Troca Iônica)	×	×	•	•	Rocha et al., 2021
Cromatografia (Afinidade)	×	•	•	•	Niven, 2003 Clonis, 1990
Cromatografia (Gel filtração)	×	×	•	•	Chimbekujwo, Ja'afaru & Adeyemo, 2020
Cromatografia de interação hidrofóbica (HIC)	×	×	×	•	Chauhan et al., 2021

• = Processo de purificação realizado; × = Processo de purificação não realizado.

Adaptado de Rocha, 2018.

2.6.2 Métodos de Purificação

2.6.2.1 Técnicas Cromatográficas

Entre os diversos métodos de purificação, a cromatografia é considerada a principal técnica de separação de biomoléculas, pois ela consiste em métodos físico-químicos capazes de separar componentes de uma mistura. A cromatografia pode ser dividida em cromatografia líquida, gasosa e de pressão, onde podemos destacar a cromatografia de exclusão molecular e a de troca iônica (Collins, 2007).

A mistura de proteínas ou outros produtos biológicos a serem separados são aplicados na fase estacionária e migram através da coluna. Os processos cromatográficos normalmente conduzem a seletividades elevadas. Os fatores que influenciam a eficiência deste processo são a qualidade do suporte cromatográfico, a dispersão axial e a dificuldade de estabelecimento de equilíbrio entre a fase móvel e

estacionária. Dependendo do tipo de interações envolvidas, os processos cromatográficos podem ser classificados em gel filtração, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa e afinidade (Aires-Barros e Cabral, 2003), bem como em fluxo rápido em sistema AKTA e de alto desempenho através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Guggisberg et al., 2012).

A cromatografia de troca iônica é uma técnica histórica amplamente utilizada para a caracterização detalhada de proteínas terapêuticas e pode ser considerada como uma técnica de referência e poderosa para a avaliação qualitativa e quantitativa da heterogeneidade de cargas (Fekete et al., 2015). Dentre os diferentes tipos de troca iônica, a cromatografia de troca catiônica é a mais utilizada para purificação e caracterização de proteínas (Svasti e Milstein, 1972).

Diversos trabalhos utilizaram técnicas cromatográficas nos processos de purificação de proteases. Chimbekujwo, Já'afaru e Adeyemo, (2020) purificaram uma protease produzida por *A. brasiliensis* utilizando a precipitação com sulfato de amônio (80%) seguido de cromatografia de gel filtração utilizando a resina Sephadex G-200. A massa molecular foi estimada em 68 KDa (SDS-PAGE) e com atividade proteolítica de 1734 U/mL.

Benmrad et al., (2019) purificou uma protease produzida por *Pleurotus sajor-caju* (cogumelo ostra) utilizando tratamento térmico (80°C por 20 min), seguida de precipitação de sulfato de amônio (35–55%) e cromatografia de troca iônica UNO Q-6 FPLC e de cromatografia de filtração em gel HPLC-ZORBAX PSM 300 HPSEC. A massa molecular foi estimada em 65 kDa por eletroforese em gel de poliácridamida de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e com atividade proteolítica de 10.500 U/mL.

De acordo com estudo realizado por Da Silva et al., (2018), a cromatografia de troca iônica utilizando a resina Sephadex A50 para a purificação da enzima proteolítica produzida por *A. tamarii* foi eficiente, resultando em uma atividade proteolítica de 2.444U/mL. Em trabalho realizado por Souza et al., (2017) purificando enzima proteolítica produzida por *A. foetidus* pelo sistema AKTA com coluna Sephacryl S-200, através da técnica de exclusão molecular, obteve uma protease purificada com atividade proteolítica 63,7 U/mL.

Salihi, Asoodeh & Aliabadian (2017) purificou uma protease alcalina produzida por *A. oryzae* utilizando duas etapas de purificação: precipitação com sulfato de amônio a 85% e cromatografia utilizando a resina Q-Sephadex. A protease obtida apresentou massa molecular de 47,5 KDa e atividade proteolítica de 952 U/mL e atividade específica de 15,86 U/mg.

Sethi et al., (2016) purificou uma protease ácida produzida por *A. terreus* utilizando a precipitação com sulfato de amônio e cromatografia utilizando a resina Sephadex G-100, obtendo uma protease com massa molecular 23,8 KDa e uma atividade proteolítica de 4366,7 U/mL com FES e 499,99 U/mL com FSm.

2.6.3 Caracterização de Proteínas

Devido à necessidade do mercado de atender o setor industrial, diversos estudos são realizados continuamente para desenvolver novos processos biotecnológicos para obtenção de enzimas proteolíticas com novas propriedades bioquímicas. Entre essas propriedades a depender da indústria podemos destacar a: alta estabilidade e atividade em pH alcalino e alta temperatura e na presença de surfactantes, íons metálicos, agentes oxidantes e solventes orgânicos (Li et al., 2011; Anbu, 2013).

Essas propriedades são importantes e são estudadas devido à diversidade de proteases que podem apresentar perfis bioquímicos diferentes.

De acordo com Silva et. al., 2018 no processo industrial as propriedades de uma proteína sofrerão influência do ambiente de produção sendo assim pH, sal, solvente, luz, temperatura, são fatores importantes que podem afetar a estrutura terciária da proteína levando a pequenas modificações que podem desestabilizar as interações intermoleculares inibindo a enzima. A caracterização biofísica e bioquímica de enzimas fornece dados importantes e úteis para aplicações industriais. Enzimas que mantêm a atividade por longos períodos de tempo e que apresentam alta atividade em uma ampla faixa de valores de pH ou temperatura são relevantes para a indústria (Melikoglu, Lin & Webb, 2013).

As enzimas possuem sensibilidade à concentração de H^+ presente no meio, existindo uma zona de pH em que a atividade enzimática é máxima. Isso ocorre

porque as enzimas possuem grupos ionizáveis que por influências da mudança do pH podem sofrer modificações estruturais que afetam sua especificidade com o substrato e a atividade catalítica dos grupos do sítio ativo (Giongo, 2006). De acordo com Silva et. al., 2018, essas mudanças conformacionais estão ligadas a alteração de distribuição de carga da proteína devido à mudança do pH.

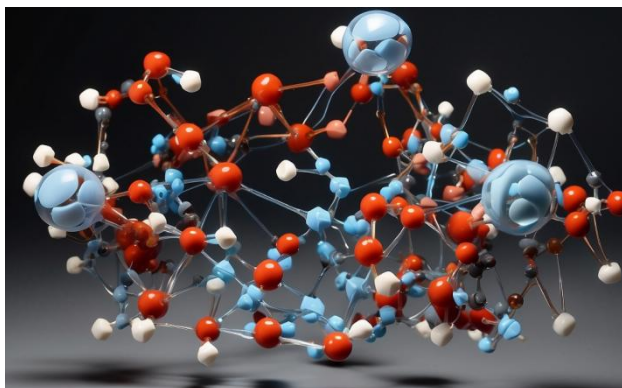
A temperatura é um fator importante no processo enzimático, pois produz efeito inibitório ou excitativo da atividade enzimática. Essa variação ocorre devido ao aumento da agitação molecular assim como a frequência das colisões entre substrato-enzima podendo ocasionar a desnaturação da enzima (Giongo, 2006). De acordo com Lehninger et al., 2000, essa velocidade de reação ou de colisão aumenta junto com a temperatura até chegar ao pico onde a enzima desempenha o máximo de sua atividade, caso a energia continue aumentando a enzima diminui sua atividade enzimática devido à desnaturação enzimática que pode ser reversível ou irreversível.

Os agentes inibidores de proteases são componentes que regulam a presença da enzima ativa. Esses podem ser divididos em duas classes: de ligação irreversível e de ligação reversível. A ligação irreversível ocorre quando o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima e modifica sua estrutura, já aqueles de ligação reversível não ocorrem modificação do sítio ativo da enzima. Estes inibidores podem ser de dois tipos, competitivo e não competitivo (Lehninger et al., 2000).

Existem diversos inibidores enzimáticos entre eles que podem ser utilizados para fornecer indícios da classificação da protease. O fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF) e o disopropil fluorofosfato (DFP) são inibidores de serino proteases e estão associados a proteases alcalinas. As metaloproteases são enzimas sensíveis a ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), ácido tetra-acético etileno glicol (EGTA) e outros agentes quelantes metálicos além de inibidores tecidual de metaloprotease (TIMP) (Chaia et al., 2020; Kumar & Takagi, 1999; Beynon, 1996).

Já as cisteínas e o aspartil são sensíveis a diazometanos e pepsatina respectivamente (Chaia et al., 2020; Beynon, 1996).

Figura 7. Mecanismo de inibição enzimática utilizando íons divalentes.



Os íons metálicos são conhecidos por desempenhar um papel de cofatores de diversas proteases nos processos fisiológicos (Butler and Robins, 1963). Diversas enzimas precisam de íons metálicos, entre estas destacam-se as metaloproteases. O íon Zn^{2+} atua como cofator da carboxipeptidase que é uma metaloprotease que hidrolisa as ligações peptídicas C-terminal das proteínas (Giongo, 2006). Entretanto o íon metálico também pode exercer um papel de inibidor. No estudo realizado por Ahmad et al. (1980) e Grover et al. (2016) foi relatado que Cu^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} atuaram como potenciais inibidores da atividade enzimática por desestabilização estrutural da proteína devido à sua interferência com resíduos sulfidríla e por quebrarem pontes dissulfeto levando à perda da atividade enzimática.

Podemos concluir que as proteases são um grupo de enzima importante para cadeia produtiva visto que através delas diversos processos industriais são melhorados e possuem uma redução do tempo de produção reduzindo o custo do produto. Entretanto a produção de protease ainda é muito cara, mas quando associada ao processo de fermentação estado sólido ocorre redução dos custos de produção devido o baixo custo do substrato utilizado para fermentação. Além disso, o processo de purificação pode ser bastante oneroso. É possível verificar que anda se faz necessário estudos tanto pra novas técnicas de produção como também para novos substratos e mecanismos de purificação mais eficiente e de menor custo.

2.7 Referências

ABIC. Indicadores da indústria de café/ 2021. 2022. Disponível em: <http://www.estatisticas.abic.com.br/estatisticas/indicadores-da-industria/indicadores-da-industria-de-cafe-2021/>>. Acesso em: 25 nov.2022

AGREBI, R.; HADDAR, A.; HAJJI M.; FRIKHA, F.; MANNI L.; JELLOULI, K. AND NASRI, M. Fibrinolytic enzymes from a newly isolated marine bacterium *Bacillus subtilis* A26: characterization and statistical media optimization. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 55, p. 1049-1061, 2009.

ALBUQUERQUE KKSA, ALBUQUERQUE WWC, COSTA RMPB, BATISTA JMS, MARQUES DAV, BEZERRA RP, HERCULANO PN & PORTO ALF. Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. *Biocatal Agric Biotechnol* v. 23, 101453, 2020

AL-DHABI, N.A., GHILAN, A.K.M., ESMAIL, G.A., ARASU M.V., DURAIPANDIYAN, V., PONMURUGAN K.. Bioactivity assessment of the Saudi Arabian Marine *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-90, metabolic profiling and its in vitro inhibitory property against multidrug resistant and extended-spectrum beta-lactamase clinical bacterial pathogens. *J. Infect. Public Health*, v.12, p. 549-556, 2019.

AN, C., L., KONG, F., D., LI, Y., MA, Q.,Y., XIE, Q.,Y., YUAN, J.,Z., ZHOU, L.,M., DAI, H., F., YU, Z., F., ZHAO, Y.,X. Asperpenes D and E from the fungus *Aspergillus* sp. SCS-KFD66 isolated from a bivalve mollusk, *Sanguinolaria chinensis*. *Journal of Asian Natural Products Research*. DOI: 10.1080/10286020.2019.1709450

ANUSHA, P., NARAYANAN, M., NATARAJAN, D., KANDASAMY, S., CHINNATHAMBI, A., ALHARBI, S.,A., BRINDHADEVI, K. Assessment of hexavalent chromium (VI) biosorption competence of indigenous *Aspergillus tubingensis* AF3 isolated from bauxite mine tailing v.282, 2021.

AROKIYARAJ, S., SARAVANAN, M., BADATHALA, V. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Taraxacum officinale* and its Antimicrobial Activity. South Indian J. Biol. Sci., v. 2, p. 115-118, 2015.

BALACHANDRAN, C. , DURAIPANDIYAN, V., , EMIL , N., IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial and Cytotoxic Properties of *Streptomyces Sp.* (ERINLG-51) Isolated from Southern Western Ghats. J. Biol. Sci., v.1, p.7-14, 2015. DOI:10.22205/sijbs/2015/v1/i1/100436

BBC RESEARCH. BBC RESEARCH : Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. 2022. Disponível em: < [https:// www. Global Enzymes Market in Industrial Applications \(bccresearch.com\)](https://www.bccresearch.com)>. Acesso em: 25 nov. 2022

BELMESSIKH, A., BOUKHALFA, H., MECHAKRA-MAZA , A., GHERIBI-AOULMI, Z., AMRANE, A. Statistical optimization of culture medium for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations on tomato pomace. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers v. 44,n. 3, p. 377-385, 2013.

BENMRAD, M.O., MECHRI, S., JAOUADI, N.Z., ELHOUL, M.B., REKIK, H., SAYADI, S., BEJAR, S., KECHAOU, N., & JAOUADI, B. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest, BMC Biotechnology, v. 19, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0536-4>

BI, B.; WANG, X.; WU, H.; WEI, Q. Purification and characterization of a novel protease from *Cordyceps sinensis* and determination of the cleavage site motifs using oriented peptide library mixtures. Food Chemistry v.126, p. 46–53, 2011.

BON,E.P.S.;VERMELHOS,A.B. Queratinase,In:SAID,S.;PIETRO,R.C.L.R. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p.291-306, 2004.

BRANDELLI, A.,DAROIT,D.J., RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. Appl Microbioal Biotecchnol, v.85,n. 6 p. 1735-1750, 2010.

BUTLER, J.A.V., ROBINS, A.B.. Effects of certain metal salts on the inactivation of solid trypsin by ionizing radiation. Radiat. Res. v.19, p.582-592, 1963.

CARDOSO, K.,B.,B., NASCIMENTO, T., P., OLIVEIRA, V.,M.,COSTA, R.,M.,P.,B., PASTRANA, L., BATISTA, J., M., S., PORTO, A.,L.,F. Protease com atividade fibrinolítica e colagenolítica produzida por *Aspergillus ochraceus* URM604 2022 (terminar as informações)

CASTRO, R. J. S., OHARA, A., NISHIDE, T.G., BAGAGLI, M. P., DIAS, F.F.G., SATO, H.H. A versatile system based on substrate formulation using agroindustrial wastes for protease production by *Aspergillus niger* under solid state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* v. 4,n.4, p. 678-684, 2015.

CHALFOUN, Sara Maria. Fungos associados a frutos e grãos do café: *Aspergillus* e *Penicillium*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

CHILAKAMARRY, C. R., SAKINAH, A. M. M., ZULARISAM, A. W., SIROHI, R., KHILJI, I. A., AHMAD, N., & PANDEY, A. Advances in solid-state fermentation for bioconversion of agricultural wastes to value-added products: Opportunities and challenges. *Bioresource Technology*. v.343, p. 1- 11, 2022.

CHIMBEKUJWO, K. I. JA'AFARU, M. I. ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2, v.8, 2020. (Chimbekujwo, Ja'Afaru e Adeyemo, 2020)

CHUTMANOP, J., CHUICHULCHERM, S., CHISTI, Y., SRINOPHAKUN,.P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 83, n. 7, p. 1012-1018, 2008.

COUTO, S.R., SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. *Journal of Food Engineering*. V.76, N.3, P. 291 – 302, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.05.022>

ELDIN, A., M., SAIDAL-SHARNOUBY, S.,F., ELGABRY, K.,I.,M., RAMADAN, A., I. *Aspergillus terreus*, *Penicillium* sp. and *Bacillus* sp. isolated from mangrove soil having laccase and peroxidase role in depolymerization of polyethylene bags, v. 118, p. 215-226, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.04.030>

ERTEKIN, Z.C., HEYDARI, H. KLUGIL, B., DINÇ, E. MULTIWAY resolution of spectrophotographic measurements for the quantification of echinuline in marine-

derived fungi *Aspergillus chevalieri* using parallel factor analysis Journal of Chromatography B v. 1193, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2022.123181>

FEKETE, S., BECK, A., VEUTHEY, J.L., GUILLARME, D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis v. 113, n. 10, p. 43-55, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.02.037>

FERNANDES, L., M., G., CUNHA, M.N.C., SILVA, J.C.S., PORTO, A.L.F., PORTO, T.S. Purification and characterization of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extracted by aqueous two-phase systems PEG/ citrate. v.317, 2020.

GHOSH, J.S. Solid state fermentation and food processing: a short review. J.Nutr. Food Sci. V.6, N. 1, P. 1 – 7, 2016.

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

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de Bacillus sp. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

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

HAILE, M., KANG, W. H. The Role of Microbes in Coffee Fermentation and Their Impact on Coffee Quality. Journal of Food Quality v.2019, 2019. Doi: <https://doi.org/10.1155/2019/4836709>

HAJJI, M.,KANOUN, S., NASRI, M., GHARSALLAH, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Process Biochemistry v.42, p. 791–797, 2007.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry, v. 46, n.10, p. 2001– 2006, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.011>

HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of Eurotium and transfer of species to *Aspergillus*. Mycologia, v. 105, n. 4, p. 912–937, 2013.

KUMURA, K., SHIMAZAKI, K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. J. Dairy Sci. v94, p.657-667, 2011 doi: 10.3168/jds.2010-3587

LIN, Y.K., XIE, C.L., XING, C.P., WANG, B.Q., TIAN, X. X., XIA, J.M., JIA, L.Y., PAN, Y.N., & YANG, X.W. Cytotoxic pterphenyls from the deep-sea-derived *Aspergillus candidus*, Natural Product Research, 2019. doi: 10.1080/14786419.2019.1633651

MANAN, M.A.; WEBB, C. Design aspects of solid state fermentation as applied to microbial bioprocessing. Journal of Applied Biotechnology and Bioengineering, v.4, n.1, p.511-532, 2017.

MATSUZAWA, T., TAKAKI, G.M.C., YAGUCHI, T., OKADA, K., ABLIZ, P., GONOI, T., HORIE, Y. *Aspergillus arcoviridensis*, a new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in State of Pernambuco, Brazil. Mycoscience, v.56,n2,p.123-131, 2015. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2014.04.006>

MATSUZAWA, T., TAKAKI, G.M.C., YAGUCHI, T., OKADA, K., ABLIZ, P., GONOI, T., HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from caatinga soil in the State of Pernambuco, Brazil. Mycoscience, v.55,n2,p.79-81, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.myc.2013.04.001>

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* Biochem. Eng. J., 80 (2013), pp. 76-82

MURTHY, P.S., KUSUMOTO, K., I. Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. Food and Bioproducts Processing v.96, p.180-188, 2015.

NIU, S., YANG, L., ZHANG, G., CHEN, T., HONG, B., PEI, S., SHAO, Z. Phenolic bisabolane and cuparene sesquiterpenoids with anti-inflammatory activities from the deep-sea-derived *Aspergillus sydowii* MCCC 3A00324 fungus Bioorganic Chemistry v.105, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104420>

OLIVEIRA, L.F., BARBOSA, R.N., ALBUQUERQUE, G.M.R., SOUZA-MOTTA, C.M., VIANA MARQUES, D.A. *Aspergillus serratalhadensis*, Persoonia, V. 40, P. 262-263, 2018.

OLIVEIRA, L.G., CAVALCANTE, M.A.Q., FERNANDES, M.J.S., LIMA, D.M.M. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. Journal of Arid Environments v. 95, p. 49 - 54, 2013

PANDEY, A., SOCCOL C.R., RODRIGUEZ-LEON, J.A., NIGAM, P. Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications, Bioresour. Technol. v.82, 2002.

PLEISSNER, D., VENUS, J. Utilization of protein-rich residues in biotechnological processes. Applied Microbiology and Biotechnology v. 100, p. 2133–2140, 2016.

PUSHPA S. MURTHY E KEN-ICHI KUSUMOTO. Acid protease production by *Aspergillus oryzae* on potato pulp powder with emphasis on glycine releasing activity: A benefit to the food industry. Food and bioproducts processing v.9, n. 6, p. 180-188, 2015

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. & DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. p. 597-635, 1998.

SANTOS, S.F.M., MACEDO, G.R., SOUZA, F.L.H.S. Aplicação da metodologia de superfície de resposta no estudo da produção e extração da poligalacturonase. Quim. Nova, v 31, n. 8, p. 1973 - 1978, 2008.

SANTOS, M.M.; ROSA, A.S.; DAL'BOIT, S.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Thermal denaturation: In solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes. Bioresource Technology, v. 93, p. 261-268, 2004.

SALIHI, A., ASOODEH, A. & ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93, v.94, p. 827-835, 2017.

SCHUSTER, F.P.W., MAFFESSIONI, C., ANGELIS, D.A., GIACHINI, A.J., CARDOSO, D.H., MORONI, L.S., SKORONSKI, E., KEMPKA, A.P. Screening and evaluation of filamentous fungi potential for protease production in swine plasma and

red blood cells-based media: qualitative and quantitative methods *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* v. 21, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101313>

SHAN,L. et al. Comparative biochemical analysis of thee bacterial prolyl andopeptidases implications for coeliac sprue. *Biochem J*, v.383, n Pt2, p.311-318, 2004

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry* v. 46, p. 579–585, 2011.

SIALA, R., FRIKHA, F., MHAMDI, S., NASRI, M., KAMOUN, A.S., 2012. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* I1 on shrimp peptone using statistical experimental design. *Sci. World J.* p. 1–11, 2012. <http://doi.org/10.1100/2012/564932>

SILVA, ALMEIDA, MELO E PORTO. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634, 2018

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil ISSN: 1981-3686 / 03 (01) 28-41, 2009.

SINGHANIA, R.R.; PATEL, A.K.; SOCCOL, C.R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 44, n.1, p. 13-18, 2009.

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

SVASTI, J., MILSTEIN, C,. The disulphide bridges of a mouse immunoglobulin G1 protein. *J.Biochem.* v.126, p. 837-850, 1972.

TAKAHASHI, K.G., KURODA, T., MUROGA, k. Purification AND antibacterial characterization of a novel isoform of the manila clam lectin (MCL-4) from the plasma of

the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: BIOCHEMISTRY AND Molecular Biology, v.150 p. 45-52, 2008

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

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

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, p. 1849–1859, 2010. doi:10.1007/s00253-009-2197-z.

WANG, S.L., CHEN, Y.H., WANG, C.L., YEN, Y.,H., CHERN, M.,K. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme and Microbial Technology. v. 36, p. 660–665, 2005.

WATANABE, Y., SHIINA, N., SHINOZAKI, F., YOKOYAMA, H., KOMINAMI, L. NAKAMURA-TSURUTA, S., HIRABAYASHI, J., SUGAHARA, K., KAMIYA, H., MATSUBARA, H., OGAWA, T., MURAMOTO, K. Isolation and characterization of 1-rhamnose-binding lectin, which binds to microsporidian *Glugea plecoglossi*, from ayu (*Plecoglossus altivelis*) eggs. Develop Comp Immunol, v.32,p.487-499,2008.

WU, T.Y., MOHAMMAD, A.W. JAHIMA, J. Md. ANUAR, N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. Enzyme and Microbial Technology v.39, p.1223–1229, 2006.doi:10.1016/j.enzmictec.2006.03.007

XU, Z.Y., ZHANG X.X., MA, J.K., YANG, Y.,ZHOU, J., XU, J. Secondary metabolites produced by mangrove endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* HQD24 with immunosuppressive activity Biochemical Systematics and Ecology v.93, 2020. doi.org/10.1016/j.bse.2020.104166

ZIMMER, K. R., BORRÉ, G. L., TRENTIN, D. S., JÚNIOR, C. W., FRASSON, A. P., GRAEFF, A. A., GOMES, P., MACEDO, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. Revista Liberato v. 10, n. 14, p. 123-137, 2009.

ZHANG, D.,YI,W., GE,H., ZHANG, Z., WU, B. A new antimicrobial indoloditerpene from a marine-sourced fungus *Aspergillus versicolor* ZZ761, Natural Product Research, 2019. DOI: 10.1080/14786419.2019.1684281

YAFETTO, L. Application of solid-state fermentation by microbial biotechnology for bioprocessing of agro-industrial wastes from 1970 to 2020: A review and bibliometric analysis. Heliyon v.8, 2022.

ZHU, X., HUA, Y., LI, X., KONG, X., ZHANG, C., CHEN, Y. Isolation and characterization of an activator-dependent protease from *Aspergillus ochraceus* screened from low denatured defatted soybean meal and the proteolysis of soy proteins. LWT - Food Science and Technology. v.150, 2021. Dóí: doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112026

3.0 Capítulo 2: Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM 5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation



An Acad Bras Cienc (2021) 93(Suppl. 3): e20200867 DOI 10.1590/0001-3765202120200867
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-3765 | Online ISSN 1678-2690
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease production by solid state fermentation

FELYPE T.B. ROCHA, ROMERO M.P. BRANDÃO-COSTA, ANNA GABRIELLY D. NEVES, KETHYLEN B.B. CARDOSO, THIAGO P. NASCIMENTO, WENDELL W.C. ALBUQUERQUE & ANA LÚCIA F. PORTO

Abstract: Solid state fermentation is a promising technology largely used in biotechnology process and is a suitable strategy for producing low-cost enzymatic products. At the present study, a novel enzyme obtained through solid state fermentation using *Aspergillus sydowii* was herein purified and characterized. The fermentations used coffee ground residue as substrate and the crude enzyme was submitted through further purification steps of: acetonic precipitation, DEAE-Sephadex and Superdex G-75 column. Both crude and purified enzymes were submitted to biochemical characterization of their thermostability, optimal temperature and pH, effects of inhibitors and metal ions. A purified protease was obtained with yield of 5.9-fold and 53% recovery, with maximal proteolytic activity of 352.0 U/mL. SDS-PAGE revealed a band of protein at 47.0 kDa. The enzyme activity was abolished in the presence of phenyl-methyl sulfonyl fluoride and partially inhibited against Triton X-100 (78.0%). The optimal activity was found in pH 8.0 at 45°C of temperature. Besides, the enzyme showed stability between 35°C and 50°C. It was possible to determine appropriate conditions to the obtainment of thermostable proteases with biotechnological interest associated with a method that concomitantly shows excellent production levels and recovery waste raw material in a very profitable process.

Key words: *Aspergillus sydowii*, biotechnology, proteases, solid state fermentation, waste coffee residue.

4.0 Capítulo 3: Production, purification and characterization of protease produced by a new *Aspergillus* specie through solid-state fermentation

Production, purification and characterization of protease produced by a new *Aspergillus* specie through solid-state fermentation

Felype Thomaz de Brito Rocha^{1,2,3}, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa², Daniela de Araújo Viana Marques², Ana Lúcia Figueiredo Porto³

¹ Keizo Asami Institute, Federal University of Pernambuco – UFPE, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brazil, 50670-901.

² Integrated Laboratory of Applied Biotechnology, Biological Science Institute, University of Pernambuco - UPE, R. Arnóbio Marquês, 310 - Santo Amaro, Recife – PE, Brazil, 50100-130.

³ Laboratory of Technology in Bioactives Products, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Dom Manoel de Medeiros street, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. Code: 52171-900.

***Corresponding author:**

Prof. Ana Porto

Laboratory of Technology in Bioactives Products, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Dom Manoel de Medeiros street, s/n, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brazil. Code: 52171-900.

E-mail address: analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

As proteases são um grupo de enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas extremamente importantes para indústria. Devido a essa importância, a fermentação em estado sólido (FES) assume um papel estratégico na

produção de proteases de baixo custo utilizando resíduo agroindustrial, além de auxiliar a atenuar os sérios danos ambientais causados pela eliminação desses resíduos na natureza. O presente trabalho teve como objetivos: utilizar uma espécie nova de um fungo filamentosos, *Aspergillus serratalhadensis*, isolado da Caatinga, para produção de proteases através da FES usando o resíduo de café como substrato; purificar a enzima alvo por processos cromatográficos e determinar as características físico-químicas da protease produzida e isolada. O extrato bruto obtido da fermentação do *A. serratalhadensis* apresentou atividade proteolítica de 1.066 U/mL e atividade específica de 293 U/mg. A protease purificada apresentou atividade proteolítica de 289,67 U/mL e atividade específica de 689,69 U/mg com a coluna DEAE Sephadex G50 e atividade proteolítica de 85, 67 U/mL e específica de 964,19 U/mg com a Superdex G75. A enzima sobre efeito de íons metálicos teve um aumento na atividade com os íons Na^+ (11,9%) e o K^+ (19,1%) e sofreu uma inibição com o íon Zn^{+2} com atividade residual de 49,5%. A atividade ideal foi obtida em pH 6,0 a 35 °C de temperatura, com a estabilidade da enzima entre 25 °C e 55 °C, mantendo 75% de sua maior atividade. Os resultados obtidos demonstram a grande potencialidade da protease obtida do *Aspergillus serratalhadensis* e do reuso de resíduos mitigando o impacto ambiental e diminuindo a emissões de CO_2 .

Palavras Chaves: *Aspergillus serratalhadensis*, protease, fermentação estado sólido, resíduo agroindustrial .

ABSTRACT

Proteases constitute a group of enzymes with the ability to hydrolyze peptide bonds, which is of utmost importance for the industry. Due to this significance, Solid-State Fermentation (SSF) plays a strategic role in the low-cost production of proteases using agro-industrial residue, thereby helping to alleviate the severe environmental damage caused by the disposal of such residues in nature. This study aimed to employ a new species of filamentous fungus, *Aspergillus serratalhadensis*, isolated from the Caatinga, for protease production through SSF using coffee residue as a substrate; purify the target enzyme through chromatographic processes; and determine the physicochemical characteristics of the produced and isolated protease. The crude

extract obtained from the fermentation of *A. serratalhadensis* exhibited proteolytic activity of 1,066 U/mL and specific activity of 293 U/mg. The purified protease showed proteolytic activity of 289.67 U/mL and specific activity of 689.69 U/mg with the DEAE Sephadex G50 column, and proteolytic activity of 85.67 U/mL and specific activity of 964.19 U/mg with the Superdex G75 column. The enzyme, under the influence of metal ions, demonstrated an increase in activity with Na⁺ ions (11.9%) and K⁺ ions (19.1%), while experiencing inhibition with Zn⁺² ions with a residual activity of 49.5%. The optimum activity was achieved at pH 6.0 and a temperature of 35 °C, with enzyme stability between 25 °C and 55 °C, maintaining 75% of its maximum activity. The results obtained underscore the significant potential of the protease derived from *Aspergillus serratalhadensis* and the reutilization of residues, mitigating environmental impact and reducing CO₂ emissions.

Keywords: *Aspergillus serratalhadensis*, protease, solid state fermentation, agro-industrial residue

4.1. Introdução

A Caatinga é um bioma exclusivamente brasileiro e ocupa uma área de 10,1% do território nacional. Bioma menos conhecido do país, entretanto dados atuais indicam possuir uma grande riqueza de ambientes e espécies, tratando-se do ambiente semi-árido com mais biodiversidade do mundo (MMA, 2022). Devido ao clima quente e seco da Caatinga, os fungos possuem uma capacidade de lidar com o estresse do ambiente adaptando-se a amplas condições mantendo a produção de enzimas. Devido a isso esses organismos podem ser utilizados para fins biotecnológicos e farmacêuticos (Kubicek et al., 2007). Em um trabalho realizado por Barbosa et al., (2020), a diversidade de fungos encontrados na Caatinga foi de 130 espécies, com maior representação para os gêneros *Aspergillus* (60) e *Penicillium* (57), sendo o solo o substrato mais comum.

Os fungos filamentosos principalmente os membros do gênero *Aspergillus* são notáveis por sua capacidade adaptativa a meios sólidos e de produção de biomoléculas, alguns dos quais podem ter aplicações em processos industriais e

farmacêuticos (Gibbons; Rokas, 2013) . Diante disso, a FES utilizando resíduos sólidos para suprir a necessidade de nitrogênio e carbono d fungo é uma forma promissora de produção de enzimas proteolíticas sustentável e economicamente viável (Schuster, et al., 2019; Belmessikh et al., 2013; Hajji et al., 2008)

Na indústria farmacêutica as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas. Entre essas aplicações podemos destacar o uso de proteases para produção de peptídeos bioativos (Balakrishnan et al., 2011) com propriedades antimicrobianas (Zhang et. al.,2021), anti-hipertensiva (Yu et al., 2021), entre outras. Diversos estudos vêm analisando o potencial biotecnológico de fungos isolados do solo da Caatinga. De acordo com Da Silva et al., (2018) a protease de *A. tamarii* URM4634 isolado do solo do sertão apresentou características importantes para a indústria de detergente.

O uso de proteases na indústria de produção experimentou um aumento considerável. No entanto, a aplicação de enzimas proteolíticas nas indústrias enfrenta desafios essenciais, como o custo de produção, pureza, rendimento, estabilidade e especificidade. Esses fatores têm impactado significativamente o desempenho global das proteases, resultando em rendimentos reduzidos (Chimbekujwo, Ja'Afaru e Adeyemo, 2020).

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o *A. serratalhadensis*, uma nova espécie de fungo filamentoso, na conversão de resíduos de café após sua preparação, por meio da fermentação em estado sólido, em uma protease purificada com potencial biotecnológico.

4.2 Metodologia

4.2.1 Materiais

Azocaseína, DEAE-sephadex G50, ácido tricloroacético, sulfato de amônio, Tris (hidroximetil) aminometano, glicina, foram adquiridos do Sigma Chemicals (St Louis, EUA). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

4.2.2 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi o *Aspergillus serratalhadensis* URM 7866 (Oliveira et al., 2018), isolado do solo do Município de Serra Talhada – PE,S7°57'21" W38°17'34", e devidamente identificado pela Coleção de Culturas da URM da

Universidade Federal de Pernambuco e cadastrado no SisGen com número de cadastro A44D9F4. As culturas foram armazenadas em BDA (Batata Dextrose Agar) à temperatura ($\pm 25^{\circ}\text{C}$).

O inóculo foi preparado suspendendo os esporos em meio de cultura Agar Batata Dextrose (BDA) em solução NaCl 0,15 M (5 mL), por 7 dias a 30°C . A quantidade de esporos foi padronizada em câmara de Neubauer (Laboroptik, Lacing, Reino Unido) para obtenção da concentração final de 10^7 esporos/mL. O volume ajustado para 40% ou 60% da umidade inicial.

4.2.3. Fermentação em Estado Sólido e extração da enzima

As fontes de carbono e nitrogênio a partir de resíduos de café foram utilizadas como substrato através da fermentação em estado sólido (FES). O resíduo foi colocado em estufa por um período de 72 horas a 50°C , para garantir a secagem completa do café. A massa utilizada para as fermentações foi de 4g e o inóculo do fungo filamentoso foi de 10^7 esporos/mL. O experimento avaliou condições como: adição de 5% de glicose, umidade (40% e 60%) e temperatura (25 e 30°C). Todas as fermentações foram realizadas em câmara de germinação (BOD), Eletrolab modelo EL202/3, até o final do processo.

A extração da protease foi feita com 30 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,0 (7,5 mL/g de substrato) foram adicionados ao meio fermentativo e a biomassa foi macerada e filtrada com auxílio de gaze. O extrato obtido passou por uma segunda filtração utilizando papel de filtro 0,22 μm . Após a etapa de filtração, o extrato bruto obtido foi coletado e utilizado na etapa de purificação subsequente.

4.2.4 Determinação de atividade proteolítica e dosagem de proteína

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Ginther (1979). Uma unidade de atividade de protease foi definida como a quantidade de enzima responsável por um aumento de 0,01 por hora na absorbância. A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Smith et al (1985).

4.2.5 Precipitação com solvente orgânico

O processo de purificação parcial foi realizado pelo método de precipitação utilizando os solventes orgânicos acetona e o etanol a 70% e centrifugado a 16.800 xg durante 10 min. Em seguida, o precipitado foi separado do sobrenadante e ressuspenso em tampão fosfato pH 6,0 a 0,1M.

4.2.6 Métodos cromatográficos

O extrato pré-purificado foi submetido a uma coluna DEAE-Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Nesse caso, as amostras foram eluídas com diferentes concentrações de soluções de NaCl (0,2 M, 0,4 M e 1 M), diluídas no mesmo tampão. A fração contendo proteína foi reunida e a solução de enzima concentrada para análise posterior, o processo foi monitorado em coluna de absorvância de 280 nm. Para ambos os procedimentos, foram recolhidas frações de 1,0 ml a um caudal de 1 ml/min após o tampão de eluição.

A análise de filtração em gel foi realizada usando tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8) adicionado de NaCl 0,15 M em um Sistema ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em Superdex 75 (HR10 / 300GL), PC 3.2 / Coluna 30, conforme descrito nas instruções do fabricante. A absorvância das amostras foi avaliada em 215 nm e 280 nm.

4.2.7 Caracterização Bioquímica

4.2.7.1 Efeito do pH e temperatura na atividade proteolítica da protease purificada

O extrato parcialmente purificado foi submetido a diversos pH através da ressuspensão em diferentes pHs: tampão acetato 0,2 M em pH 5,0 e 6,0 e tampão Tris-HCl 0,2 M em pH 7,0, 8,0 e 9,0; em seguida, realizou-se a determinação da atividade proteolítica.

O extrato parcialmente purificado foi submetido a diferentes temperaturas de reação de 25 ° C a 70 ° C em intervalos de 5 ° C, em seguida, realizou-se a determinação da atividade proteolítica.

4.2.7.2 Determinação da termoestabilidade ao pH e à temperatura

O extrato parcialmente purificado foi submetido a diversos pH através da ressuspensão da enzima em diferentes tampões com diferentes pHs: tampão acetato

0,2 M em pH 5,0 e 6,0 e tampão Tris-HCl 0,2 M em pH 7,0, 8,0 e 9,0 e mantido por 60 minutos antes de serem submetidos a atividade proteolítica. O extrato parcialmente purificado foi submetido a diferentes temperaturas variando de 5°C, de 25°C a 85°C, por 30 e 60 minutos, em seguida, realizou-se a determinação da atividade proteolítica.

4.2.7.3 Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica

Para avaliar o efeito dos íons metálicos na atividade da protease, o extrato bruto (150 µL) foi precipitado com acetona, em seguida, resuspenso com 150 µL de soluções íons Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} e Co^{+2} a 0,2 M durante 30 minutos.

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Produção da enzima por FES

Na fermentação em estado sólido, alguns fatores como umidade, temperatura, e adição de glicose foram avaliados (Tabela 1), visando estudar os parâmetros que influenciam no processo de produção de protease. A maior produção de proteases por *A. serratalhadensis* (1.066 U/mL) foi obtida nas seguintes condições: 60% de umidade, 25 °C e com adição de 5% de glicose para o 4g de substrato (café) em 7 dias de fermentação.

Comparando com estudos de produção de proteases utilizando fungos filamentosos e resíduos, Rocha et al. (2021) observaram uma produção de 352 U/mL utilizando como substrato a borra de café pelo *A. sydowii*; Novelli et al. (2015) usando farelo de trigo como substrato obteve uma atividade proteolítica total de 40 U/mL para *A. oryzae* e 37 U/mL para *A. flavipes SB*. Esses mesmos autores estudaram ainda a produção de protease usando o farelo de soja e obtiveram, 30 U/mL (*A.niger SB*), 23 U/mL (*A. brasiliensis*) e 33 U/mL (*A. flavipes SB*) de atividade total. Esses resultados são bem inferiores aos obtidos na FES do *A. serratalhadensis* mostrando ser um microrganismo promissor para produção de proteases.

O café por sua vez, possui uma concentração proteica mais estável com uma concentração de 15,75% (Silva, Ascheri & Pereira, 2007) enquanto o farelo de trigo varia entre 9,6 – 18,6% (Onipe, Jideani & Beswa, 2015) e o farelo de soja que fica entre 13,2 – 18,4% (Apprich et al. 2013). Essa maior concentração de proteína observada no

café pode permitir uma estabilidade maior como substrato na produção de protease por fungo filamentosos.

Tabela 1: Condições da Fermentação em Estado Sólido utilizando o resíduo do café como substrato para produção de proteases pelo *Aspergillus serratalhadensis*

Glicose (5%)	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Atividade total da protease (U/mL)	Desvio Padrão	Atividade específica da protease (U/mg)
S	40	25	526	0,126	189
N	40	25	476	0,139	157
S	40	30	784	0,108	228
N	40	30	645	0,119	197
S	60	25	1066	0,173	293
N	60	25	726	0,258	212
S	60	30	695	0,140	213
N	60	30	698	0,307	204

S= foi suplementado com glicose. N= Não teve suplemento de glicose

Segundo Chimbekujwo, Já'afaru e Adeyemo, 2020, diversos fatores influenciam o processo de fermentação, entre estes, destacam-se: o pH, a temperatura, o tempo de produção e a disponibilidade de carbono e nitrogênio do substrato.

No estudo realizado por esses autores, o *A. brasiliensis* foi submetido a diversos substratos como fonte de carbono (farelo de arroz, casca de arroz, espiga de milho, casca de inhame, casca de frutas cítricas, sorgo e farelo de trigo) e obteve melhor resultado de produção da enzima, utilizando casca de frutas cítricas com atividade proteolítica de 1.604 U/mL. Em relação à fonte de nitrogênio estudada (extrato de levedura, peptona, extrato de carne, leite desnatado, farelo de soja, gelatina e nitrato de amônio), o melhor resultado foi obtido utilizando o extrato de levedura a 2% com

atividade proteolítica 1.515,99 U/mL. Valores semelhantes ao obtido neste presente trabalho utilizando resíduo de café pelo *A. serratalhadensis*.

De acordo com Sethi et. al., 2016 que, utilizando *A. terrus*, estudaram diversos resíduos agroindustriais (incluindo bolo de óleo de mostarda, bolo de óleo de neem, bolo de óleo de amendoim, cascas de grama preta, cascas de grama verde, cascas de ervilha de pintinho, cascas de grama de capim ervilha, farelo de trigo, resíduos de milho de pérola, resíduos de milho, quebra de arroz, cascas de banana, bagaço de maçã e cascas de laranja) como substrato, concluíram que a casca de ervilha foi o mais adequado para a produção de protease tendo uma atividade proteolítica máxima de 5.266,8 U/mL, entretanto todos os demais substratos utilizados também foram eficientes na produção de protease por FES.

De acordo com Souza et al., 2017, para a produção de protease é indispensável a disponibilidade de fontes de carbono e nitrogênio no meio de cultivo, pois ambos exercem um efeito regulatório na síntese enzimática. No entanto, o processo metabólico de cada fungo é diferente, sendo assim a capacidade de utilizar uma dada fonte de carbono ou nitrogênio difere de um microrganismo para outro. As espécies de *Aspergillus*, por exemplo, usam uma grande variedade de substratos para o crescimento e têm diferentes vias bioquímicas para assimilação desses nutrientes.

Em estudo realizado por Srinubabu, Lokeswari & Jayarajul, 2007, utilizando diversos substratos (glicose, frutose, sacarose, lactose, dextrina e amido), constatou-se que a glicose foi o melhor suplemento seguido pela frutose. As demais fontes de carbono atingiram um aumento entre 50 e 60% em comparação com o aumento fornecido pela glicose. Já em relação ao nitrogênio, os autores estudaram fontes inorgânicas (Nitrato de sódio (NaNO_3), Nitrato de potássio (KNO_3), cloreto de amônio (NH_4Cl), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e dihidrogenofosfato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) e orgânicas (peptona, hidrolisado de caseína e ureia), sendo o dihidrogenofosfato de amônio, o que apresentou melhor desempenho com 450 U/mL entre as fontes inorgânicas.

Entre as fontes orgânicas, a peptona apresentou maior atividade com 490 U/mL, seguido pelo hidrolisado de caseína (480 U/mL) e a ureia (456 U/mL). Esse estudo

mostra a importância da fonte de carbono e nitrogênio não apenas da quantidade, mas também o tipo, levando em conta o metabolismo do fungo utilizado.

Esses dados corroboram com dados encontrados no nosso trabalho onde os parâmetros que possuem a suplementação com glicose apresentaram maior produção de protease do que comparado com os parâmetros que não tiveram suplementação, com exceção do parâmetro a 60% com 30°C que tiveram produção similar. A utilização da glicose para o *A. serratalhadensis* mostrou ser um suplemento importante promovendo um aumento na produção de aproximadamente 46% no melhor parâmetro de fermentação tendo atividade proteásica de 1.066 U/mL.

No estudo realizado por Srinubabu, Lokeswari & Jayarajul, 2007, a atividade proteásica foi bem menor (450 U/mL) utilizando o $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ e 490 U/mL usando a triptona. Em trabalho realizado por Rocha et al. (2021) utilizando o *A. sydowii* e resíduo de café como substrato e sem suplementação de glicose foi obtido a atividade proteásica de 352 U/mL, valor esse menor do que obtido com o *A. serratalhadensis* utilizando o mesmo substrato e com adição de glicose.

Diante do exposto podemos inferir que o resíduo de café é um meio adequado para o desenvolvimento de fungo do gênero *Aspergillus*, suprimindo a necessidade de nitrogênio e carbono tornando-se um substrato valioso para promover a produção de proteases pelo fungo *Aspergillus serratalhadensis*. Além disso, é possível verificar a alta produção de enzimas proteolíticas pelo *A. serratalhadensis* sendo um fungo promissor para utilização na biotecnologia.

4.3.2 Purificação da Enzima

A purificação foi dividida em duas etapas a primeira parte denominada de purificação parcial e a segunda etapa purificação final (Figura 01). Na etapa de purificação parcial foi realizado utilizando a precipitação com solvente orgânico utilizando etanol e acetona a 70% tiveram um aumento sutil de 6% em relação à atividade proteolítica em ambos os solventes com atividade proteolítica de 1.135 U/mL e 1.134 U/mL respectivamente, contudo a acetona apresentou uma redução dos pigmentos liberados na etapa de extração.

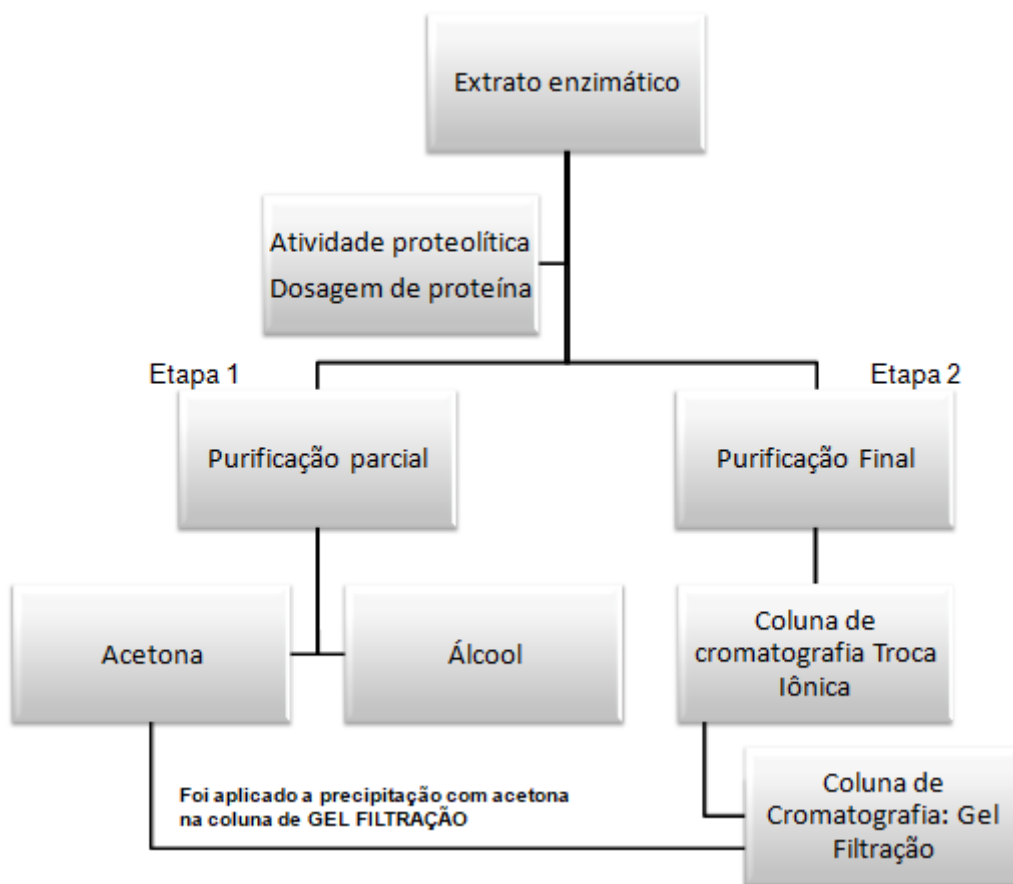


Figura 01: Sequência do processo de purificação da protease.

Na purificação final foram utilizadas duas técnicas. A primeira foi à cromatografia de troca iônica (DEAE – Sephadex G50), que obteve uma enzima com grau de pureza de 2,35, obtendo apenas um único pico ativo (Figura 2), e foi possível observar uma atividade específica de 689,69 U/mg (Tabela 2).

A segunda etapa do processo consistiu na aplicação da técnica de cromatografia de gel de filtração. Tanto a fração eluída, conforme ilustrado na Figura 02, quanto o extrato precipitado foram submetidos a uma coluna Superdex 75. A Figura 03 (a) exhibe o perfil cromatográfico do precipitado cetônico, enquanto a Figura 03 (b) revela o pico isolado resultante da cromatografia de troca iônica, demonstrando a eficácia do processo de purificação da resina DEAE-Sephadex G50 para a enzima produzida pelo *A. serratalhadesi*. Os resultados na Tabela 02 indicam uma atividade proteolítica de 85,67 U/mL e uma atividade específica de 964,19 U/mg para o pico isolado na Figura 02 (b). Notavelmente, a cromatografia empregando o sistema AKTA com resina

Sephadex G75 alcançou um nível superior de purificação, atingindo um fator de purificação de 3,29 em comparação com todas as etapas de purificação anteriores.

De acordo com Etzel, (1995) e Pereira, (1999) a coluna de troca iônica teve um resultado mais eficiente em relação à etapa de precipitação, pois apresenta maior resolução na hora de separar as biomoléculas. De acordo com Teotia (2001), a precipitação é utilizada na fase inicial da purificação, pois possui baixa resolução e é utilizado para eliminação de excesso de contaminantes e/ou clarificação de amostra.

Em trabalho realizado por Chimbekujwo, Já'afaru e Adeyemo, (2020) que purificaram uma protease produzida por *A. brasiliensis* utilizando a precipitação com sulfato de amônio (80%) seguido de cromatografia de gel filtração utilizando a resina Sephadex G-200. A atividade proteolítica obtida foi de 1.734 U/mL. O fator de purificação de 7,70 e de recuperação 29% para a resina Sephadex G-200.

De acordo com estudo realizado por Da Silva et al., (2018), a cromatografia de troca iônica utilizando a resina Sephadex A50 para a purificação da enzima proteolítica produzida por *A. tamarii* foi eficiente, resultando em uma atividade proteolítica de 2.444 U/mL. O fator de purificação 6,9 e recuperação 62%.

Em trabalho realizado por Souza et al., (2017) purificando enzima proteolítica produzida por *A. foetidus* pelo sistema AKTA com coluna Sephacryl S-200, através da técnica de exclusão molecular, obteve uma protease purificada com atividade proteolítica 63,7 U/mL, fator de purificação de 16,85 e recuperação de 100%.

Tabela 02: Etapas do processo de purificação da protease produzida por *Aspergillus serratalhadensis*.

Etapas do Processo de Purificação	Proteína total (mg)	Atividade Proteolítica (U/mL)	Atividade específica (U/mg)	Fator de purificação	Recuperação (%)
Extrato bruto	3,63	1.066	293,42	1	100
Precipitação com Acetona	3,49	1.134	324,37	1,11	94
Precipitação com Etanol	3,44	1.135	329,94	1,11	94

DEAE Sephadex G50	0,42	289,67	689,69	2,35	12
Superdex G75	0,09	85,67	964,19	3,29	3

Salihi, Asoodeh & Aliabadian (2017) purificaram uma protease alcalina produzida por *A. oryzae* utilizando duas etapas de purificação: precipitação com sulfato de amônio a 85% e cromatografia utilizando a resina Q-Sephadex. Os autores observaram uma atividade proteolítica 952 U/mL e atividade específica de 15,86 U/mg. O fator de purificação de 1,32 e recuperação de 18,13%.

Sethi et al., (2016) purificou uma protease ácida produzida por *A. terreus* utilizando a precipitação com sulfato de amônio e cromatografia utilizando a resina Sephadex G-100, obtendo uma atividade proteolítica de 4.366,7 U/mL com FES e 499,99 U/mL com FSm. O fator de purificação de 1,6 e recuperação de 3,08%.

No presente trabalho, a amostra oriunda do processo cromatográfico em sistema de troca iônica foi submetida à cromatografia em gel filtração utilizando a resina Superdex increase. O processo de separação na técnica de gel filtração apresentou a enzima com peso molecular estimado em 68 kDa. A Figura 2 demonstra o pico obtido na técnica de gel filtração, evidenciando o pico único da enzima proteolítica.

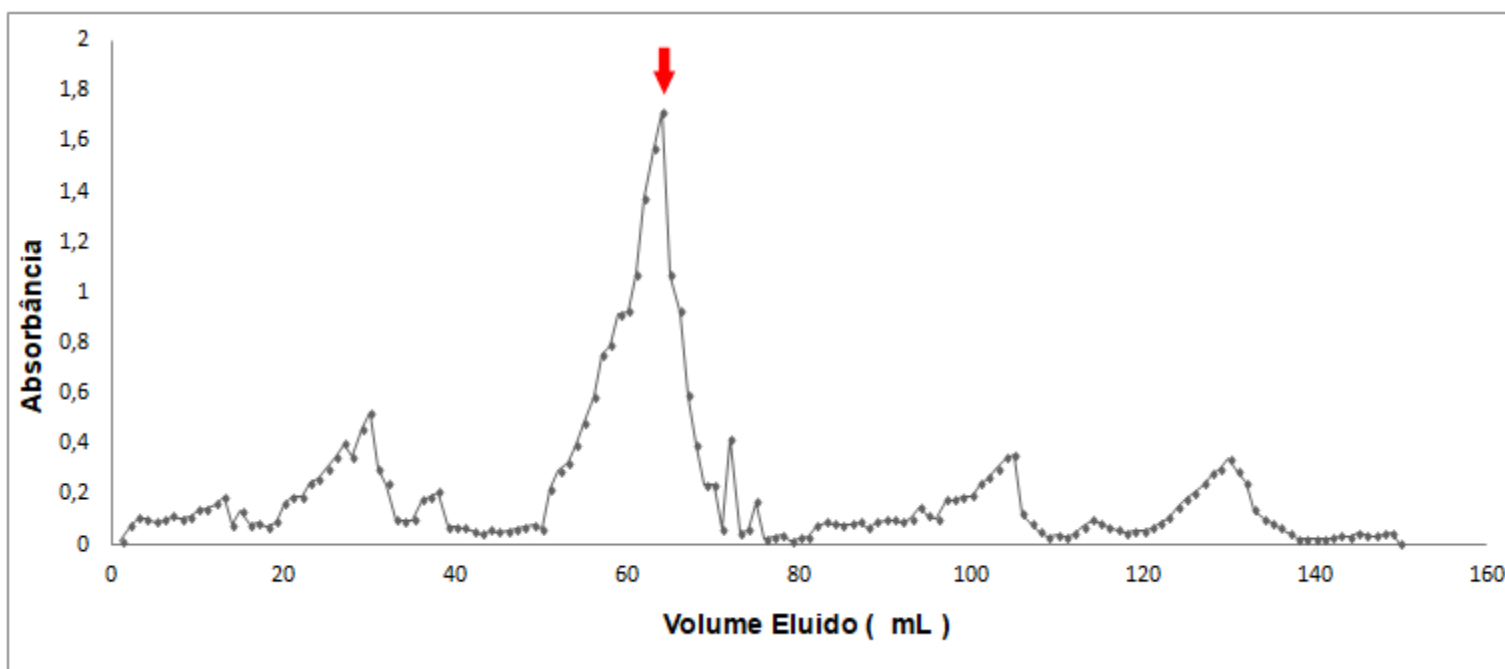
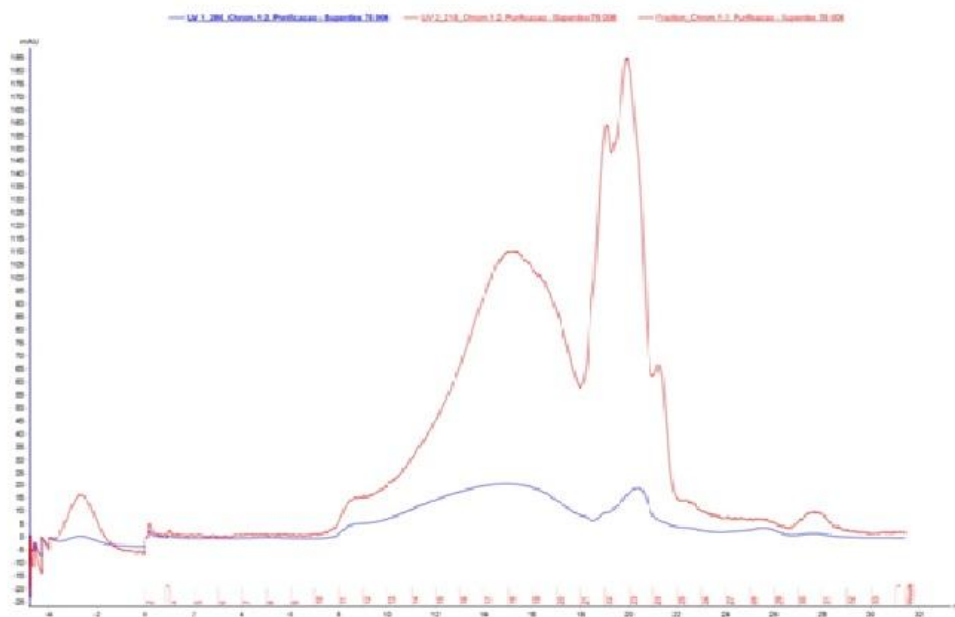
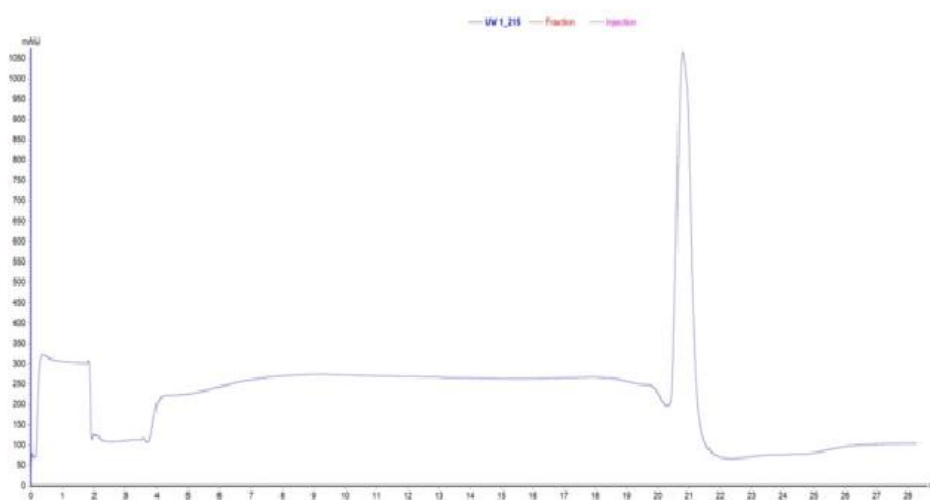


Figura 02: Perfil do cromatograma do processo de purificação da protease produzida pelo fungo *A. serratalhadensis* na cromatografia de troca aniônica DEAE-Sephadex. A marca mostra as frações contendo atividade proteolítica. Leitura realizada no comprimento de onda de 280nm.



A



B

Figura 03. Cromatograma do processo de purificação da protease produzida pelo fungo *A. serratalhadensis* em gel filtração na resina Superdex G-75 HR 10 300 GL.

Absorbância monitorada em 215nm e frações coletadas em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.. a) Primeira execução: Perfil cromatográfico do precipitado cetônico. b) Segunda execução: Perfil cromatográfico do pico isolado da DEAE-Sephadex G50.

4.3.3 Efeitos de inibidores e metais na atividade de protease

A atividade da protease purificada em diferentes cátions foi determinada (Fig. 04). Os cátions NaCl e KCl proporcionaram um aumento da atividade proteolítica da enzima para 111,9% e 119,1% respectivamente. Além disso, o ZnSO_4 promoveu uma redução significativa na atividade proteolítica, tendo uma atividade relativa de 49,5%.

De acordo com Benmrad et al., (2019) Os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} potencializaram a atividade sendo o Ca^{2+} o que mais se destacou tendo uma atividade relativa de 270%, por outro lado, os íons Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} promoveram uma redução na atividade proteolítica. Os íons Hg^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} foram os que apresentaram maior inibição não apresentando atividade. O Co^{2+} e o Ba^{2+} apresentaram uma inibição enzimática intermediária com atividade relativa de 60% e 75% respectivamente. Já o Zn^{2+} , apesar da alta inibição ele manteve atividade relativa de 40%.

Achados semelhantes foram descritos por Da Silva et al., (2018) Os íons Mg^{2+} (101,2% com 5mM e 104,5% com 10 mM) e Ca^{2+} (102,9% com 5 mM) potencializaram já o que apresentou maior redução na atividade proteolítica foi Zn^{2+} (59,4% com 5mM e 20,8% com 10mM) inibiu a atividade proteolítica.

Devi et al., 2008 e Hajji et al., 2007, trabalhando com a influência do Zn^{2+} na atividade proteolítica de proteases obtidas a partir de *A. niger* e *A. clavatus*, respectivamente, obteve redução na atividade de 80 e 94 %, para as espécies citadas.

A variação na atividade proteolítica de certas proteases pode ser atribuída à sua dependência de pequenas moléculas não proteicas, conhecidas como cofatores. Estes cofatores podem ser categorizados em íons metálicos e coenzimas (Moraes et al. 2013). A diminuição da atividade proteolítica está relacionada à capacidade dos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Hg^{2+} atuarem como inibidores enzimáticos, perturbando a estrutura proteica ao interferir nos resíduos de sulfidrila e romper as ligações dissulfeto, resultando na perda de atividade enzimática. (Grover et al. 2016; Ahmad et al.,1980).

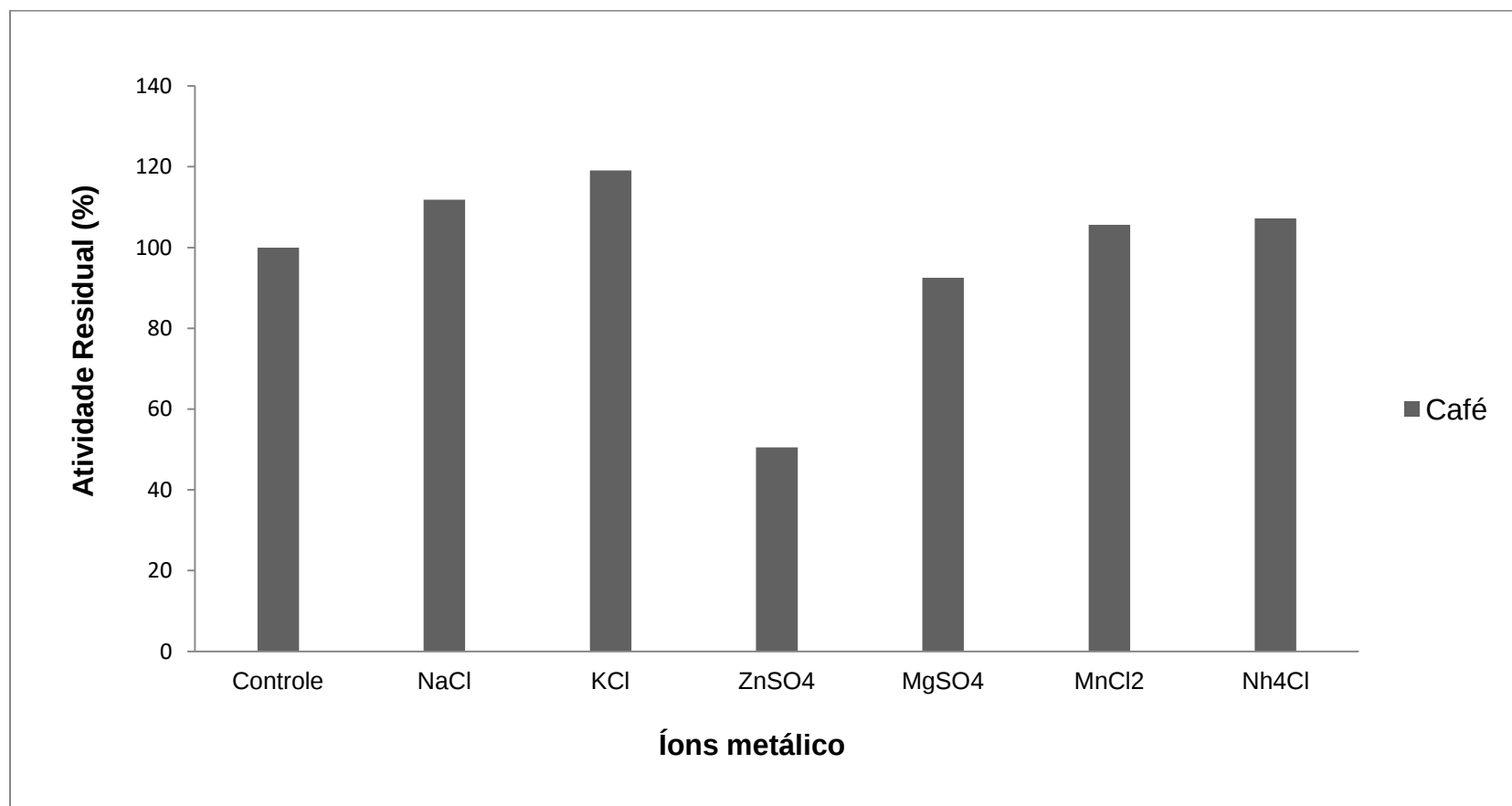


Figura 04: Efeito de íons metálicos na atividade proteolítica da enzima purificada pela coluna de troca iônica DEAE-Sephadex G50.

Os dados obtidos na pesquisa sugerem que a enzima possua como cofatores o Na^+ e o K^+ , eles ajudam na estabilização da enzima a altas temperaturas. Além disso, os dados obtidos sugerem que seja uma metaloprotease por apresentar íons metálicos como cofatores enzimáticos. É possível inferir que a enzima produzida pelo *Aspergillus serratalhadensis* apresentam resíduos sufridila podendo ou não apresentar pontes dissulfetos.

4.3.4 Efeitos da temperatura e do pH na atividade e estabilidade

O ensaio de atividade enzimática em diferentes faixas de pH mostrou que a enzima teve sua atividade ótima no pH 6 (Fig.05) e manteve uma estabilidade entre os valores de pH 5 e 10, sendo que na faixa entre 8 e 10 apresentaram atividade relativa próximo de 80% e 70%, respectivamente. A temperatura para a atividade máxima da protease foi de 35 °C com atividade proteolítica de 1.066 U/mL, com um decréscimo lento e gradual mantendo atividade até 80°C com atividade proteolítica de 37 U/mL.

A estabilidade térmica é um fator essencial para a aplicação de proteases. A proteína aqui estudada foi ativa entre 25°C a 80°C (Fig.06), onde teve sua atividade reduzida para 19%, e foi termoestável no intervalo entre 25°C a 55°C a 60 minutos, onde manteve 65% da sua atividade.

De acordo Afzal et. al., (2005) esse efeito da temperatura pode ser explicada em duas etapas. Primeiro, as interações hidrofóbicas são enfraquecidas em temperaturas mais baixas, mas tornam-se mais fortes quando a temperatura é aumentada, enquanto as interações iônicas se comportam em uma maneira oposta. Em segundo lugar, as interações hidrofóbicas aprimoradas compensam o aumento da agitação térmica em temperaturas mais altas, evitando assim o desdobramento térmico. Parece que se as cadeias laterais hidrofóbicas de uma enzima estiverem muito próximas, o efeito de uma entropia negativa é visualizado em temperaturas mais altas, desde que o sítio ativo da enzima mantenha sua estrutura.

Diferente do que foi observado no presente trabalho, Chimbekujwo, Já'afaru e Adeyemo, (2020) utilizando o *A. brasiliensis* estudaram os efeitos da influência do pH e da temperatura na atividade de uma protease. A atividade máxima foi observada no pH 9 (2.304 U/mL) e temperatura ótima ocorreu à 30°C (2.318 U/mL), a enzima foi estável na faixa de pH 4-6 mantendo uma atividade relativa superior a 90%, já na estabilidade

térmica a protease se manteve estável na faixa de temperatura de 30 até 40 °C mantendo atividade relativa superior a 85%. Em pesquisa feita por Souza et al., (2017) com *A. foetidus*, a protease purificada apresentou maior atividade no pH 5 com atividade proteolítica de 51,6 U/mL. Em relação à temperatura ótima a maior atividade proteolítica foi obtida a 55 °C.

Em estudo realizado por Wanga et al., 2004 e Hernández-Martínez et. al., 2011 trabalhando com a influência do pH e da temperatura. Entre os pH estudados o pH ótimo foi de 8 e 7 respectivamente. Na avaliação da temperatura, a temperatura ótima foi de 40°C e 60°C respectivamente. No trabalho realizado por Wanga et al., 2004 a enzima manteve-se estável na faixa entre 25 e 50 °C, já no de Hernández-Martínez et. al., (2011) a enzima manteve-se estável faixa de temperatura entre 50 e 80 °C.

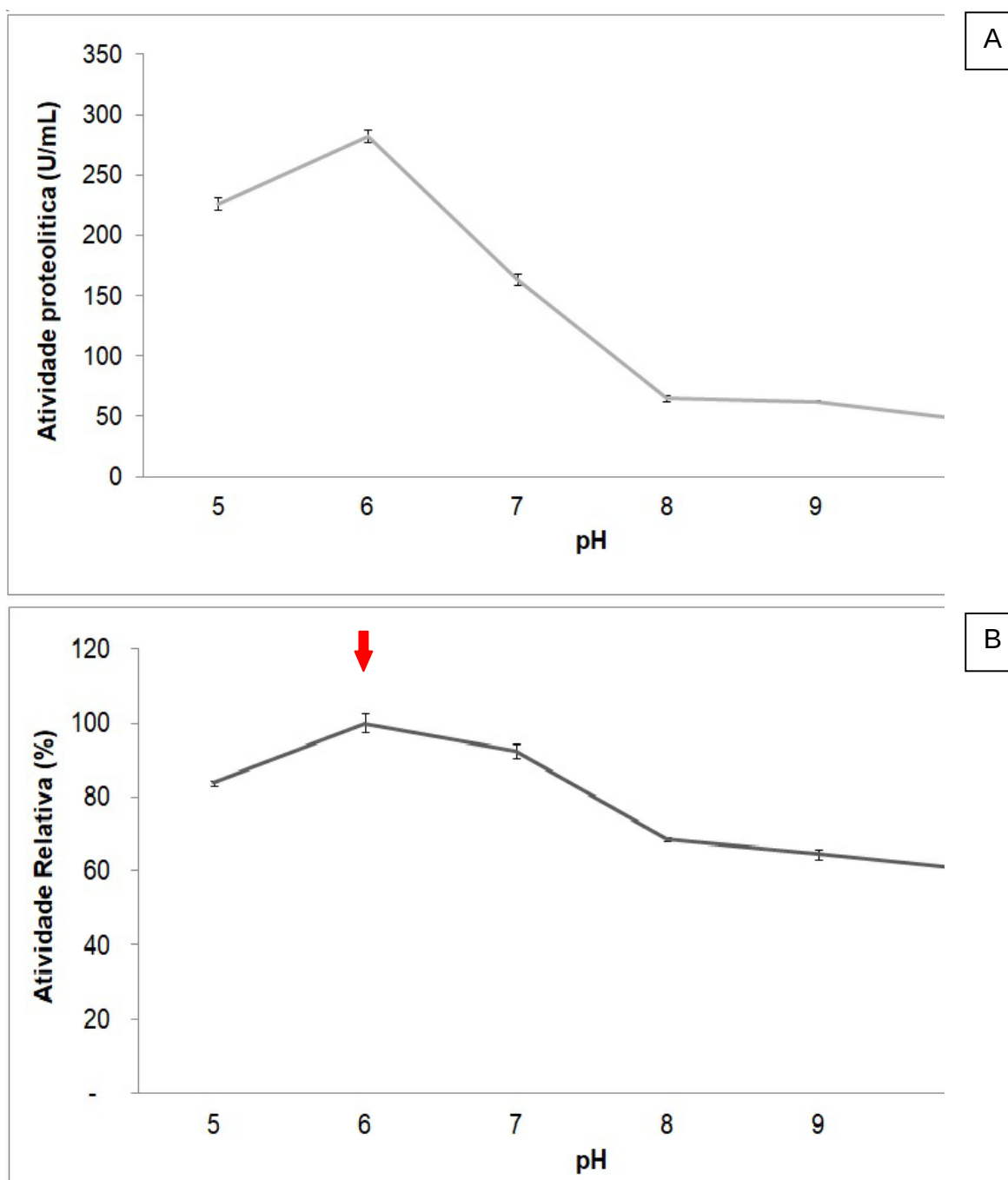


Figura 05: Curva do pH ótimo (A) e estabilidade (B) da protease purificada obtida da fermentação do *Aspergillus serratalhadensi*. A marca indica o 100% da estabilidade.

Em trabalho realizado com os fungos *A. oryzae* e *A. flavipes*, a atividade de protease manteve-se estável até 50°C, quando houve declínio acentuado da atividade, possivelmente devido à desnaturação da protease (Negi e Banerjee, 2009). Vishwamatha, 2009, utilizando *A. oryzae*, apresentou os resultados de produção de protease com temperatura ótima a 55°C e se manteve estável entre 40-57°C.

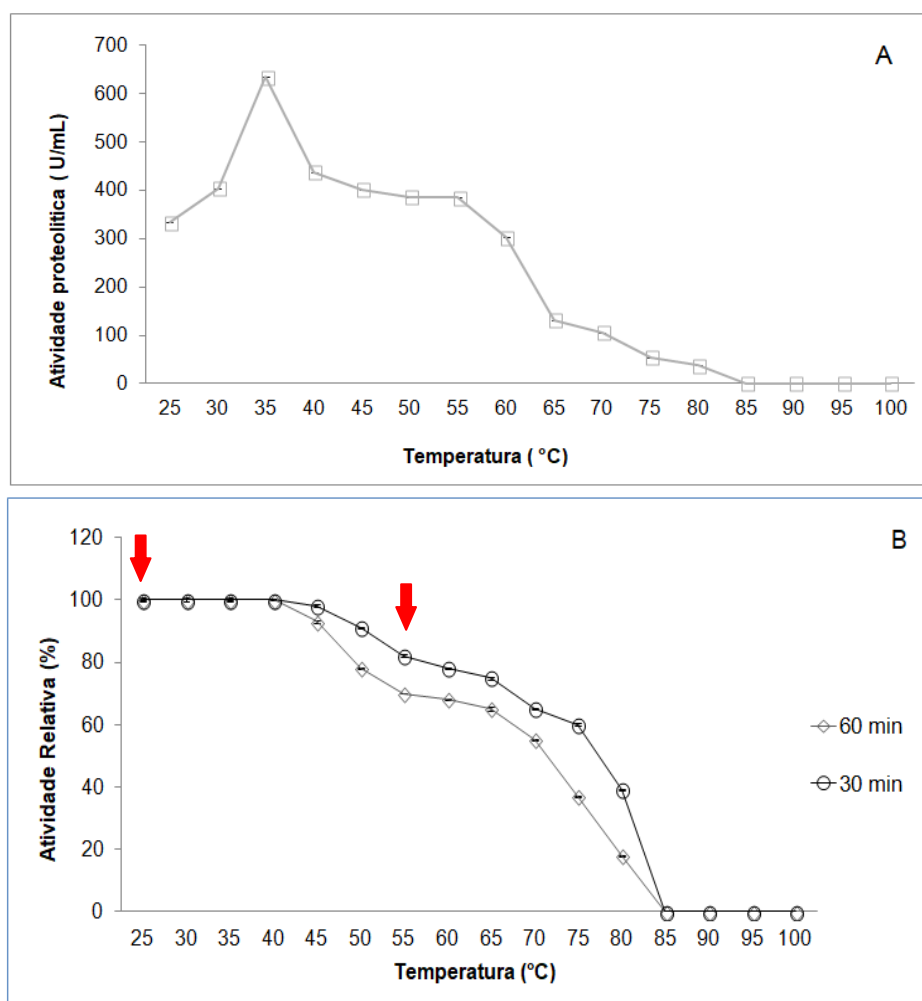


Figura 06: Curva da estabilidade (A) e temperatura ótima (B) da protease purificada obtida da fermentação do *Aspergillus serratalhadensis*. A marca em vermelho indica o 100% da estabilidade.

4.4 Conclusão

Este estudo evidenciou que a protease gerada pelo fungo *A. serratalhadensis* possui potencial biotecnológico para aplicação na indústria. As características

observadas sugerem que a enzima pode ser classificada como uma metaloprotease, dada a similaridade com propriedades físico-químicas típicas desse grupo. No entanto, investigações futuras serão necessárias para identificar potenciais aplicações biológicas oferecidas por essa protease.

Agradecimentos

Os autores agradecem a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa de doutorado e juntamente com a FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo financiando o presente estudo.

4.5 Referências

- AFZAL A, Ali S, LATIF F, RAJOKA M, SIDDIQUI K. Innovative kinetic and thermodynamic analysis of a purified superactive xylanase from *Scopulariopsis* sp. *Appl Biochem Biotechnol* 2005;120:51–70.
- AHMAD, Z., SALEEMUDDIN, M., SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of army worm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem.* v.10, p.667-673, 1980.
- BALAKRISHNAN, B., PRASAD, B., RAI, A. K., VELAPPAN, S. P., SUBBANNA, N. M., & NARAYAN, B. In vitro antioxidant and antibacterial properties of hydrolysed proteins of delimed tannery fleshings: Comparison of acid hydrolysis and fermentation methods. *Biodegradation*, v.22,p. 287–295, 2011.
- BARBOSA, R.N., BEZERRA, J.D.P., SANTOS, A.C.S., MELO, R. F.R., HOUBRAKEN, J., SOUZA-MOTA, C.M. Brazilian tropical dry forest (Caatinga) in the spotlight: an overview of species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* (Eurotiales) and the description of *P. vascosobrinhou* sp. Nov. *Acta Botanica Brasílica*, v. 34, n. 2, p. 409-429,2020.
- BELMESSIKH, A., BOUKHALFA, H., MECHAKRA-MAZA, A., GHERIBI-AOULMI, Z., AMRANE, A. 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.* V.44, n 3, p. 377–385, 2013. <http://doi.org/10.1016/j.jtice.2012.12.011>.
- BENMRAD, M.O., MECHRI, S., JAOUADI, N.Z., ELHOUL, M.B., REKIK, H., SAYADI, S., BEJAR, S., KECHAOU, N., & JAOUADI, B. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable protease from the oyster mushroom *Pleurotus sajor-caju* strain CTM10057 with industrial interest, *BMC Biotechnology*, v. 19, p. 1-18, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0536-4>
- CHAUHAN, J.V., MATHUKIYA, R.P., SINGH, S.P., GOHEL, S.D. Two steps purification, biochemical characterization, thermodynamics and structure elucidation of thermostable alkaline serine protease from *Nocardiaopsis alba* strain

- OM- 5. International Journal of Biological Macromolecules, v. 169, p. 39–50, 2021.
- CHIMBEKUJWO, K. I. JA'AFARU, M. I. ADEYEMO, O. M. Purification, characterization and optimization conditions of protease produced by *Aspergillus brasiliensis* strain BCW2, v.8, 2020. (Chimbekujwo, Ja'Afaru e Adeyemo, 2020)
- CROUS, P.W. WINGFIELD, M.J. BURGESS, T.I. HARDY, G.E.ST.J. GENÉ, J. GUARRO, J. BASEIA, I.G. GARCÍA, D. GUSMÃO, L.F.P. SOUZA-MOTTA, C.M. THANGAVEL, R. ADAMČ BARILI, A. BARNES, C.W. BEZERRA, J.D.P. BORDALLO, CANO-LIRA, J.J., DE OLIVEIRA, J.F., ERCOLE, R.J.V., HUBKA, E., ITURRIETA-GONZÁLEZ, V., KUBÁTOVÁ, I., MARTÍN, A., MOREAU, M.P., MORTE, P.A. , et al. ; Fungal Planet description sheets: 716-784. PERSOONIA , v. 40, p. 240-393, 2018.
- DEVI, M.K., BANU, A.R., GNANAPRABHA, G., PRADEEP,B., PALANISWAMY, M. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents, Indian J. Sci. Technol. v.1, p. 1-6, 2008.
- EITEN, G. (1994) Vegetação do Cerrado. In M. N. Pinto (ed.), Cerrado: caracterização, ocupação e perspectivas (pp. 17-73). Editora da Universidade de Brasília: Brasília, DF, Brasil.
- ETZEL, M.R. Whey protein isolation and fractionation using ion exchangers. In: BIOSEPARATION processes in foods. New York: Marcel Dekker, (1995) 389-415.
- GINTHER, C.L., 1979. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*, Antimicrob. Agents Chemother. 15, 522–526. doi:10.1128/AAC.15.4.522.
- GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

- Grover, S., Kaur, S., Gupta, A.K., Taggar, G.K., Kaur, J. Characterization of trypsin like protease from *Helicoverpa armigera* (Hubner) and its potential inhibitors. P. Natl. A. Sci. India B. p.1-8, 2016.
- HAJJI, M., KANOUN, S., NASRI, M., GHARSALLAH, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1, Process Biochem. v.42, p. 791–797, 2007.
- HEE-SO, P. JUN, S.C., HAN, K.H., HONG,S.B., YU, J.,H.. Diversity, Application, and Synthetic Biology of Industrially Important *Aspergillus* Fungi DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2017.03.001>
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R., GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G., BERGMANN, C.W., LOERA-CORRAL, O.,ROJO-DOMÍNGUEZ, A., HUERTA-OCHOA, S., PRADO-BARRAGÁN, L.A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigates*, Process Biochem, v. 46, p. 2001–2006, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.013>.
- JOHNVESLY, B., & NAIK, G. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. Process Biochemistry, 37(2), 139–144, 2001 doi:10.1016/s0032-9592(01)00191-1
- KUBICEK, C.P., DRUZHININA, I.S., ESSER, K. Fungi in extreme environments. In: Esser, K. (Ed.), *Mycota: a Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research* v.4, pp. 85 -103, 2007
- MMA. Ministério do Meio Ambiente. 2022. Caatinga. Disponível em <[HTTP://WWW.gov.br/mmapt-br/assuntos/ecossistema-1/biomas/caatinga](http://WWW.gov.br/mmapt-br/assuntos/ecossistema-1/biomas/caatinga)>. Acessado em 27 Dez. 2022.
- NEGI, S, BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor, Food Res. Int. 2009;42, 443– 448. doi:10.1016/j.foodres.2009.01.004
- NOVELLI, P.K, BARROS, M.M, FLEURI, L.F., 2016. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization, Food Chem. 198, 119–124. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.089.

- PEREIRA, J.A.M. Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis* sp. em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1999. 138 p. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
- POR, F. D., IMPERATRIZ-FONSECA, V. L., & LENCIONI NETO, F. (2005). Biomes of Brazil: an illustrated natural history / Biomas do Brasil: uma história natural ilustrada. Pensoft Publishers: Sofia, Bulgaria.
- ROCHA, F.T.B., COSTA, R.M.P.B., NEVES, A.G.D., CARDOSO, K.B.B., NASCIMENTO, T.P., ALBURQUERQUE, W.W.C., PORTO, A.L.F. Purification and characterization of a protease from *Aspergillus sydowii* URM5774: Coffee ground residue for protease, *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, v. 93, p.1-13, 2021.
- production by solid state fermentation
- SALIHI, A., ASODEH, A. & ALIABADIAN, M. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93, v.94, p. 827-835, 2017.
- SETHI, B.K, JANA, A, NANDA, P.K, Das MOHAPATRA, P.K, SAHOO, S.L., 2016. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels, *J. Taibah Univ. Sci.* 10, 571–583. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.11.001>
- SILVA, R., F., ASCHERI, J.L.R., PEREIRA, R.G.F.A. Composição centesimal e perfil de aminoácidos de arroz e de pó de café. *Alim. Nutr.*, v.18,n3,p.325-330, 2007.
- SILVA, O.S., ALMEIDA, E.M., MELO, A.H.F., PORTO, T.S. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.117, p. 1081-1088, 2018.
- SMITH, D, KROHN, P.K, HERMANSON, R.I, MALLIA, G.T, GARTNER, A.K, PROVENZANO, F.H, FUJIMOTO, M.D, GOEKE, E.K, OLSON, N.M, KLENK, B.J., 1989. Measurement of protein using bicinchoninic acid.pdf, *Anal. Chem.* 150, 76–85.

- SOUZA, P. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*, (2017), 1-8.. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055)
- SRINUBABU,G., LOKESWARI, N. e JAYARAJU K.. Screening of Nutritional Parameters for the Production of Protease from *Aspergillus oryzae* E-Journal of Chemistry <http://www.e-journals.net> v. 4, n. 2, p. 208-215, 2007.
- TEOTIA, S.; KHARE, S.K.; GUPTA, M.N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, 28,(2001) 792–795.
- WU, T.Y., MOHAMMAD, A.W. JAHIMA, J. Md. ANUAR, N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology* v.39, p.1223–1229, 2006.doi:10.1016/j.enzmictec.2006.03.007
- YU.J, MIKIASHVILI, N. BONKU, R. et al. Allergenicity, antioxidant activity and ACE-inhibitory activity of protease hydrolyzed peanut flour *Food Chem*, 360 (2021), Article 129992, 10.1016/j.foodchem.2021.129992
- ZHANG, Q., TONG, X., QI, B., et al. Changes in antioxidant activity of Alcalase-hydrolyzed soybean hydrolysate under simulated gastrointestinal digestion and transepithelial transport *J. Funct. Foods.*, 42 (2018), pp. 298-305, 10.1016/j.jff.2018.01.017

5.0 Conclusões

Foi possível concluir que as condições físicas, químicas e biológicas são fatores que determinaram o sucesso de uma nova linhagem de fungo na produção de protease para fins industriais. Com isso os experimentos desenvolvidos até aqui possibilitam chegar as seguintes conclusões:

- Tanto o *A. sydowii* (256 U/mL) como o *A. serratalhadensis* (1066 U/mL) apresentaram habilidade para se desenvolverem no meio de cultivo contendo como substrato o pó de café, sendo o *A. serratalhadensis* o fungo que melhor se adaptou, apresentando maior produção de protease.
- A protease produzida pelo *A. sydowii* purificada por cromatografia de troca iônica apresentou atividade proteolítica de 352 U/mL e um fator de purificação de 4,09. A enzima teve pH e temperatura ótimo em 8 e 45 °C respectivamente. Ela manteve-se estável na faixa de pH de 6 a 8 e temperatura entre 25 e 45 °C.
- A protease produzida pelo *A. serratalhadensis* purificada por cromatografia de troca iônica apresentou atividade proteolítica de 289,67 U/mL e um fator de purificação de 2,35. A enzima teve pH e temperatura ótimo em 6 e 35 °C respectivamente. Ela manteve-se estável na faixa de pH de 5 a 10 e temperatura entre 25 e 55 °C.

Essas considerações demonstram que a realização de estudos do processo fermentativo com objetivo de aproximar das condições ambientais para o crescimento microbiano é essencial quando se deseja obter melhores resultados. Assim, a partir do desenvolvimento de um bioprocesso eficiente é possível garantir maior sucesso quando da sua aplicação na indústria.

APÊNDICES A - Purification and characterization of a thermostable protease from *Aspergillus sydowii*: Coffee ground residue as an excellent substrate for protease production by solid state fermentation

Felype Thomaz de Brito Rocha¹, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa^{2,1(*)}, Anna Gabrielly Duarte Neves¹, Kethylen Barbara Barbosa Cardoso¹, Thiago Pajeú Nascimento¹, Wendell Wagner Campos Albuquerque³, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Laboratory of Technology in Bioactives Products, Federal Rural University of Pernambuco - UFRPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

²Laboratory of Advances in Protein Biotechnology (LABIOPROT), University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

³Institute of Food Chemistry and Food Biotechnology, Justus Liebig University Giessen, Heinrich-Buff-Ring 17, Giessen, 30392 Germany.

*Corresponding author:

Prof. Romero Brandão-Costa, Ph.D

Laboratory of Advances in Protein Biotechnology (LABIOPROT), University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail address: romero.brandao@upe.br

Abstract

Solid state fermentation is a promising technology largely used in a biotechnology process and is a suitable strategy for producing low cost enzymatic products. At the

present study, a novel enzyme obtained through solid state fermentation using *Aspergillus sydowii* as microorganism was herein purified and full characterized. The fermentations used coffee ground residues as substrate and the crude enzyme were submitted through further purification steps of: acetonic precipitation, DEAE-Sephadex and Superdex G-75 column. Both crude and purified enzymes were submitted to a characterization of their thermostability, optimal temperature and pH, effects of inhibitors and metal ions. A purified protease (47.0 kDa) was obtained with high yield (5.9-fold) and recovery (53%) with maximal proteolytic activity of 352.0 U/mL. The enzyme was highly inhibited by PMSF (60%) and the ion Cu^{+2} (56.5%). the optimal activity was found in pH 8, at 45°C of temperature, with the enzyme stability between 35°C and 50°C (maintaining 70% of its highest activity). It was possible to determine appropriate conditions to the obtainment of thermostable proteases with biotechnological interest associated with a method that concomitantly shows excellent production levels and recovery waste raw material in a very profitable process.

Keywords: Proteases; *Aspergillus sydowii*; waste coffee residue; biotechnology; solid state fermentation.

1. Introduction

Agricultural waste recovery associated with the development of techniques of conversion of raw material into economically useful products makes research of bioconversion by microorganisms increasingly relevant. Production of proteases using solid substrates through fermentative processes is pointed out in the present study as a low-cost alternative for waste recovery (Novelli et al., 2016; Albuquerque et al., 2020).

Proteases hydrolyze peptide bonds and provide essential modifications in proteins which are involved in the process of digestion, activation of enzymes, blood clotting and membrane transport. They have a variety of functions and represent approximately 60% of the enzyme world market, being often used in detergent, leather, pharmaceutical and food industries (Castro et al., 2014; Albuquerque et al., 2020).

Processes for obtaining proteases derived from plants are slow because the long period of plant. At the same time, proteases from animal origin (for example pepsin, chymosin and trypsin) need to be prepared in larger scale and are dependent on the cattle for slaughter, what hinders its use. Microbial proteases, on the other hand, are considered commercial profitable enzymes, because their biochemical diversity, rapid growth, and fast and safe production (Mansor et al., 2019), presenting therefore higher economic potential.

Aspergillus is in the order Eurotiales also comprising the genera *Penicillium*, which are known to have a potential for producing various metabolites such as antibiotics, organic acids, medicines or enzymes, milk-clotting enzymes and extracellular proteases (Silva et al., 2018). Filamentous fungi are widely applied for production of enzymes as amylases, lipases, proteases and pectinases (Sethi et al., 2016), and the processes are advantageous for their low cost of materials, high production and recovery, since they are obtained from the extracellular medium (Vishwanatha et al., 2010; Souza et al., 2015). The genus *Aspergillus* is the most common filamentous fungi used in industry.

The solid-state fermentation (SSF) provides some advantages over the submerged (SMF) such as: the use of agricultural residues as substrates (wheat bran, soybean, rice, bagasse, and nuts); requires low amount of water; produces more concentrated metabolites; obtained by stationary process (causing no energy costs); and in most cases the enzyme yield is higher (Zenebon et al., 2008).

With high production of the world coffee industry, a lot of waste is generated, and it is estimated that 9.9 million solid waste are produced annually worldwide (Tang et al., 2020) which draws attention to a high waste of raw materials and environmental damage.

Disposal of residues in agro-industrial processes represents a large financial disadvantage that could be prevented from reuse of raw material for obtaining biotechnological enzymes (Albuquerque et al., 2020). The present work aims to follow the multistep process (production, purification, characterization, and application) for

converting coffee ground residues into a purified protease through solid state fermentation by *Aspergillus sydowii*.

2. Methods

2.1 Chemicals

Azocasein, DEAE-sephadex G50, trichloroacetic acid, ammonium sulphate, b-mercaptoethanol, Tris (hydroxymethyl) aminomethane, glycine, Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) and protein markers of molecular weights were purchased from Sigma Chemicals (St Louis, USA). Ammonium persulfate, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (TEMED), acrylamide, sodium dodecyl sulfate (SDS) and Coomassie Brilliant Blue R-250 were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.2 Microorganism

The microorganism used was the *Aspergillus sydowii*, isolated from the coffee grounds and duly identified by the URM Culture Collection of the Federal University of Pernambuco. The cultures were stocked in the medium Potato Dextrose Agar (PDA) in room temperature.

2.3 Inoculum Preparation

The inoculum was prepared by suspending the spores in the culture medium Potato Dextrose Agar (PDA) in 0.15 M NaCl solution (5 mL), for 7 days at 30°C. The number of spores was standardized in a Neubauer chamber (Laboroptik, Lacing, United Kingdom) to obtain the final concentration of 10^7 spores/mL. The volume adjusted to 60% of initial moisture, at pH neutral, was subsequently used to inoculate Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 4 grams of coffee residue according to Nascimento et al (2017).

2.4 Solid State Fermentation (SSF)

Solid state fermentation (SSF) was used as carbon and nitrogen source from coffee ground residues. The coffee residues were obtained from the university restaurant in the Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, Brazil, and kept in oven for a period of 72 h at 50° C, to ensure complete drying of the coffee to obtain a constant weight. The fermentations were carried out with 4 g of coffee residue, during 120 h, at 30°C, according to Zenebon et al. (2008) and deposited in a germination chamber (BOD) until the end of the process. The compositions of the solid-state fermentation consisted 125 mL Erlenmeyer flasks containing 5.0 g of wheat bran as a substrate (moisture content of 40%) which were sterilized by autoclaving at 121 °C, for 20 min, inoculated with the suspension of *A. sydowii* spores (final concentration 10^7 spores/mL), and incubated at 30 °C for 72 h. After incubation, 7.5 mL of 100 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 were added per g of substrate and the flasks were placed in an orbital shaker at 150 rpm for 120 min at 25 °C $\pm$ 2.

2.5 Enzyme Extraction

For the protease extraction, 7.5 mL (0.1 M Tris-HCl buffer pH 8.0) per gram of substrate was added to the fermentative medium and the moisture was macerated and filtered through filter paper. After harvested by centrifugation, the extract supernatant was used as crude enzyme to the subsequent purification steps (Nascimento et al., 2017).

2.6 Determination of Protease Activity

Protease activity was measured as described by Ginther (1979). Assay mixtures of 1.0 mL containing 0.2 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM CaCl₂, 1% Azocasein and 150 μ L of enzymatic purified, were incubated at 28 °C for 1 h. After stopping the reaction by adding 1.0 mL of 10% trichloroacetic acid, samples were centrifuged at 3,000 g for 15 min, and 0.8 mL of the supernatant was transferred into a second tube containing 0.2 mL of 1.8 M NaOH. Finally, samples were blended in a vortex mixer, and the absorbance was measured at λ 420 nm. One unit of protease activity was defined as the amount of enzyme responsible for a 0.1 increase per hour in the absorbance.

2.7 Protein measurements

Protein concentration was determined according to the method of Smith et al. (1985). Bovine serum albumin was used as standard protein for protein determination.

2.8 Ketonic precipitation

The partial purification process was performed using the method of precipitation with acetone at 70% and centrifuged at $16.800 \times g$ during 10 min (Nascimento et al., 2017). Then the precipitate was separated from the supernatant and resuspended in Tris-HCl buffer pH 8.0.

2.9 DEAE-Sephadex Chromatography

The pre-purified extract was submitted through a DEAE-Sephadex G-50 column, equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. In this case, the samples were eluted with different concentrations of NaCl solutions (0.3 M, 0.6 M and 1 M), diluted in the same buffer. The protein-containing fraction was pooled, and the enzyme solution concentrated for further analysis, the process was monitored at 280 nm absorbance column. For both procedures, fractions of 1.0 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min after elution buffer. All the steps were done according to Nascimento et al. (2017).

2.10 Gel Filtration Chromatography

Gel filtration analysis was performed by using Tris-HCl buffer 0.1 M (pH 8) added of 0.15 M NaCl in an ÄKTA Avant 25 System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) on Superdex 75 (HR10/300GL), PC 3.2/30 column, as described in the manufacturer's instructions. The absorbance of the samples was evaluated at 215 nm and 280 nm. The column was calibrated using a mixture of molecular weight markers (1 mg/mL each): bovine serum albumin, carbonic anhydrase and albumin from chicken egg and a trypsin inhibitor. All the steps were done according to Nascimento et al. (2017).

2.11 Electrophoresis and protein staining

The SDS-PAGE method was performed according to Laemmli (1970) with a 10% resolving gel and a 5% stacking gel, under non-reducing conditions. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue and kept incubated for 15 h at room temperature under gentle shaking.

2.12 Biochemical characterization

2.12.1 Effect of inhibitors and metal ions on proteinase activity

To evaluate the effect of inhibitors and metal ions the protease activity, the crude extract (150 μ l) was precipitated and precipitated with acetone, then resuspended with 150 μ L of Phenyl-methyl-sulfonyl-Fluor solutions (PMSF), ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), Beta-Mercaptoethanol and ions Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} and Co^{+2} at 0.2 M during 30 minutes. All the steps were done according to Nascimento et al. (2017).

2.12.2 Effect of pH and temperature on protease activity the partially purified, and potential hydrolysis of azocasein

The optimum pH was determined by re-suspending the extracts in different buffers with different pH: acetate buffer 0.2M at pH 5.0 and 6.0 and 0.2 M Tris-HCl buffer at pH 7.0, 8.0 and 9.0. The extracts were subjected to different reaction temperature from 25°C to 70°C in intervals of 5°C. All the steps were done according to Nascimento et al. (2017). After FPLC, an aliquot was pooled, evaporated, and later resuspended with 1.0 mL of 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution, and an aliquot (50 μ L) was submitted to high performance liquid chromatography (HPLC) and eluted using a 0 – 90% acetonitrile. The samples were applied sequentially to reverse - phase high performance liquid chromatography (RP - HPLC) coupled to an electro spray ionization mass spectrometer (ESI - MS) using an LC/ MS - 2020 EV (Prominence Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan). The chromatography process was assessed on a C18

column (Ultra sphere, 5 μ m, 4.6 $\times$ 250 mm) and monitored using a UV-detector (Shimadzu UV – vis SPD - 20AV) at 220 – 365 nm.

2.12.3 Determination of thermostability

The partially purified extract was subjected to different temperatures varying from 5°C, from 25°C to 70°C for 60 minutes and then performing the measurement of activities. All the steps were done according to Nascimento et al. (2017).

2.12.4 Effect of inhibitors on protease activity

To evaluate the effect of inhibitors on enzyme activity, the purified enzyme was exposed to the following protease inhibitors: phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (10 mM), 2-mercaptoethanol (10 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (10 mM), Pepstatin A (1mM) and Iodoacetic acid (10mM). Each inhibitor was dissolved according to the Sigma protocol and incubated for 30 min at 25°C with the enzyme. The enzyme activity without inhibitor was considered as control (100%).

2.13 Statistical analysis

All data were analysed statistically using the General Linear Models procedure of the Statistix 8.1 software package (Analytical Software, St Paul, MN, USA) and presented as the mean $\pm$ standard error (SE). All assays were done in triplicate.

3. Results and discussion

3.1 Enzyme Production

Factors such as humidity, temperature, extraction type and time of incubation were studied aiming to optimize the production of protease. *A. sydowii* was able to produce a protease (crude extract) with high activity (specific activity of 8.59 U/mg and a content proteolytic 89.8 mg/mL). The humidity, temperature and the time of incubation showed the best production at 60%, 30°C and 5 days, respectively, in comparison with other tested conditions. The data also demonstrate that the coffee ground is a valuable

substrate for protease production, since 4.0 g of coffee residue was enough to produce 1.16 mg/mL of protease with 256 U/mL of activity. Proteases are proteolytic enzymes that catalyze the cleavage of peptide bonds in proteins. These enzymes form a very large and diverse group of complex enzymes which have different properties such as a substrate, an active site and a catalytic mechanism, optimal pH and a profile of stable temperatures (Silva et al., 2018).

3.2 Enzyme Purification and Electrophoresis (SDS-PAGE)

Partial purification by acetone precipitation concentrated and consequently increased the protease specific activity (see table 1). In this step, the enzyme was recovered by 93% with 2.11-fold purification. Novelli et al. (2016) using wheat bran and soybean meal as substrate for fermentations by *Aspergillus* did not exceed the value of 40 U/mL of protease activity with this pre-purification step.

The subsequent two chromatographic steps (anion-exchange and gel filtration chromatography) improved the enzyme purity, reflected in the enzyme recovery and yield and in the obtaining of a single active peak. For that, the partially purified enzyme was applied in a DEAE-Sephadex G50 column, resulting in the obtaining of two protease fractions eluted by NaCl (1 M). The eluted protein fraction, correspondent to the peaks highlighted in the Figure 1, showed a 4.09-fold purification (specific activity of 242.0 U/mg). Further, the active peaks were concentrated and then submitted through a Superdex G-200 column, what resulted in a varied pattern of protein, however with single protease fraction. That fraction was selected and re-submitted into the same Superdex G75 column, obtaining a single active peak with 51% protease recovery and 5.94-fold purification (specific activity of 352 U/mg). The isolated peak obtained in the chromatogram 2 (Fig.2) was correlated to a band of 47.0 kDa in the electrophoresis, showing a homogenous enzyme fraction under non-reducing conditions (Fig. 3).

3.3 Effects of inhibitors and metals on the protease activity

Figure 4 shows the influence of inhibitors and metal ions on the protease activity. Among the inhibitors, PMSF and EDTA presented the highest levels of inhibition,

decreasing the residual activity to 30.4% and 45.7% of their initial value, respectively. An inhibition of 70% of the protease activity by PMSF indicates that the enzyme is a serine protease.

Among the metal ions, the presence of Cu^{+2} and Zn^{+2} provided the lowest residual protease activity, with 43.5% (53 U/mL) and 47.3% (58 U/mL), respectively. The ion Ca^{+2} , in contrast, increased by 30% the residual protease activity, acting as an inductor of activity. According to Purushothaman et al (2019) the catalytic activity of many enzymes depends on smaller molecules, called non-protein cofactors according to the cofactors known can be grouped into two classes: metal ions and the coenzymes.

Negi and Banerjee (2009) purified a protease from *Aspergillus awamori* and found no inhibition using PMSF and EDTA. About the activity under presence of metal ions, Zn^{+2} promoted a slight increase in activity, different from the data presented in this paper.

Asker et al. (2013) have discussed the inhibition for both PMSF and EDTA, where the complete inhibition of protease by PMSF is highly indicative of the presence of serine residue in active site, although the inhibition by EDTA might lead a misinterpretation of the inhibition causes, since a large number of enzyme require calcium for their activity, and EDTA as chelator could hinder the calcium effect.

3.4 Effects of temperature and pH, and inhibitors on the protease activity and stability

In Figure 5, we observed that the temperature for the maximum protease activity was 45°C for all the extracts, however the activity was abruptly decreased in the interval of 5°C, achieving a decrease of up 68% (for the crude extract). The thermal stability is an essential factor for application of proteases. The protein herein studied was active and thermostable from 25°C to 55°C (low activity levels were kept until 60°C).

In work carried out by Singh et al (2017) with *Aspergillus oryzae*, the protease activity remained stable up to 50°C, when there was a sharp decline of the activity, possibly due to denaturation of the protease. These data corroborate the data presented in this paper.

Regarding the optimal temperature was observed to 40°C showed a proteolytic activity of 478 U/mL as shown in Figure 5. Similar results were found in fungal protease derived from fermentation of *Aspergillus flavipes* with the optimum temperature being 50°C Novelli et al (2016), and *Myceliophthora* sp. with optimum temperature was between 40 to 45°C (Zanphorlin et al., 2011).

Previous studies indicated the improved thermostability of proteins with increased levels of some glycosylation (Lim et al 2019). The protease purified in this work and confirmed by electrophoresis not shown glycosylation by Schiff technique (data not shown). Among the tested protease, the remaining activity of purified protease increased slightly at temperatures above 60°C but the activity declined to 10% at 100°C.

Figure 6 shows that the optimum pH for the crude and purified extracts. The enzyme maintained considerable activity during 1h of incubation in pH between 5.0 and 9.0, although under acidic conditions the activity was constantly decreased. The pH 8 provided the best activity levels for all the extracts, what evidences the alkaline character of the enzyme, although next to neutral pH, since after pH 9 the activities of all extracts decreased abruptly. This makes the protease suitable to applications in neutral-alkaline environments.

According to studies by Markaryan et al. (1994) using *Aspergillus fumigatus* was shown a pH optimum between 7.5 and 8 and Souza et al. (2017) *A. foetidus* with the optimum pH was between 8-9 but keeping a high rate of activity between pH 5-9 and *A. flavipes* the optimum pH was 8 having a good performance in the enzymatic activity in the pH range 7-9. Similar results to those found in this research. This broad pH range of proteases produced must be due to the genus *Aspergillus* ability to adapt to a wide pH range having as preferred pH acid being one acidophilus. This genus has the ability to modify the pH of the medium because of the ability to acidify the medium according to Straat et al. (2014).

In Table 2, the purified protease was unaltered by all inhibitors, except Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) is a well-known inhibitor of serine-protease (Table 2). The purified protease from *Aspergillus sydowii* was strongly inhibited by PMSF, suggesting that the protease exhibits the serine amino acid near the active site,

indicating to be a serine-collagenase. Effect of inhibition by PMSF has also been reported in serine-proteases. The moderate stability of protease in the presence of chelating agents like EDTA is a requirement for any detergent enzyme since EDTA is used in detergent formulation as a water softener.

The ability of the enzyme produced by *A. sydowii* to hydrolyze azocasein was accessed using the optimum parameters 45°C and pH 8.0 (Figure 7). Our findings are in agreement with the report on fungi like *Aspergillus niger*, *Mucor disperses* NRRL 3103 and *A. elegans* NRRL 3104 which were studied for their substrate specificity. Hydrolysis of azocasein has been considered to be the source of the fermented compounds. Degradation of proteins like azocasein increases the free amino acid content during fermentation processing, particularly for glutamic acid and alanine, which are considered to be the most important substances for producing the characteristic taste and flavour for example in meats.

4. Conclusion

The enzyme from *Aspergillus sydowii* produced by solid state fermentation using coffee residues was herein purified and proved to have a biotechnological potential for use in the detergent industry and leather softening as well as a possible solution to the impact environment caused by the coffee grounds of disposal. The findings were presented can be useful for the enzyme industry since they represent a way to manage the waste of raw converting into a viable economic product.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco) for funding the present study.

References

- Albuquerque, K. K. S. A., Albuquerque, W. W. C., Costa, R. M. P. B., Batista, J. M. S., Marques, D. A. V., Bezerra, R. P., Herculano, P. N., Porto, A. L. F., 2020. Biotechnological potential of a novel tannase-acyl hydrolase from *Aspergillus sydowii* using waste coir residue: Aqueous two-phase system and chromatographic techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, 101453. doi:10.1016/j.bcab.2020.101453.
- Asker, M. M. S., Mahmoud, M. G., El Shebwy, K., Abd el Aziz, M. S., 2013. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 11(2), 103–109. doi:10.1016/j.jgeb.2013.08.001.
- Castro, R. J. S., Nishide, T. G., Sato, H. H., 2014. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4), 236–245. doi:10.1016/j.bcab.2014.06.001.
- Ginther, C. L., 1979. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(4), 522–526. doi:10.1128/aac.15.4.522.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685. doi:10.1038/227680a0.
- Lim, L., Senba, H., Kimura, Y., Yokota, S., Doi, M., Yoshida, K. I., Takenaka, S., 2019. Influences of N-linked glycosylation on the biochemical properties of aspartic protease from *Aspergillus glaucus* MA0196. *Process biochemistry*, 79, 74-80. doi:10.1016/j.procbio.2018.12.017.
- Mansor, A., Ramli, M. S., Abdul Rashid, N. Y., Samad, N., Lani, M. N., Syarifuddin, S. A., Siva Manikam, R. V., 2019. Evaluation of selected of agri-industrial residues as potential substrates for enhanced tannase production via solid-state fermentation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20, 101216. doi:10.1016/j.bcab.2019.101216.
- Markaryan, A., Morozova, I., Yu, H., Kolattukudy, P. E., 1994. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus*

- and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infection and Immunity*, 62(6), 2149-2157.
- Nascimento, T. P., Sales, A. E., Porto, T. S., Costa, R. M. P. B., Breydo, L., Uversky, V. N., Porto, A. L. F., Converti, A., 2017. Purification, biochemical, and structural characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Mucor subtilissimus* UCP 1262. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(8), 1209–1219. doi:10.1007/s00449-017-1781-3.
- Negi, S., Banerjee, R., 2009. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. *Food Research International*, 42(4), 443–448. doi:10.1016/j.foodres.2009.01.004.
- Novelli, P. K., Barros, M. M., Fleuri, L. F., 2016. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization. *Food Chemistry*, 198, 119–124. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.089.
- Purushothaman, K., Bhat, S. K., Singh, S. A., Marathe, G. K., Appu Rao, A. R. G., 2019. Aspartic protease from *Aspergillus niger*: Molecular characterization and interaction with pepstatin A. *International Journal of Biological Macromolecules*, 139, 199-212. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.07.133
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(3), 597-635.
- Sethi, B. K., Jana, A., Nanda, P. K., Das Mohapatra, P. K., Sahoo, S. L., 2016. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. *Journal of Taibah University for Science*, 10(4), 571–583. doi:10.1016/j.jtusci.2015.11.001.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., Klenk, D. C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76–85. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
- Singh S. B. 2017. Purification and characterization of a protease-resistant phytase of *Aspergillus oryzae* SBS50 whose properties make it exceptionally useful as a

- feed supplement. *International Journal of Biological Macromolecules*, 103, 458-466.
- Souza P.M., Werneck G., Aliakbarian B., Siqueira F., Junior A. P, 2017. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*. *Food and Chemical Toxicology*, 109, 1103-1110.
- Silva, O. S., de Almeida, E. M., de Melo, A. H. F., Porto, T. S., 2018. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaraii* URM4634. *International journal of biological macromolecules*, 117, 1081-1088. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.002.
- Souza, P. M., Bittencourt, M. L. de A., Caprara, C. C., de Freitas, M., Almeida, R. P. C. de, Silveira, D., Fonseca, Y. M., Ferreira Filho, E. X., Pessoa Junior, A., Magalhães, P. O., 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 337–346. doi:10.1590/s1517-838246220140359.
- Tang J., Chen T., Hu Q., Lei D., Sun Q., Zhang S., Zeng C., Zhang Q, 2020. Improved protease activity of Pixian broad bean paste with co-cultivation of *Aspergillus oryzae* QM-6 and *Aspergillus niger* QH-3. *Electronic Journal of Biotechnology*. doi.org/10.1016/j.ejbt.2020.01.001.
- Vishwanatha, K. S., Appu Rao, A. G., Singh, S. A., 2009. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(6), 1849–1859. doi:10.1007/s00253-009-2197-z.
- Zanphorlin, L. M., Cabral, H., Arantes, E., Assis, D., Juliano, L., Juliano, M. A., Da-Silva, R., Gomes, E., Bonilla-Rodriguez, G. O., 2011. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochemistry*, 46(11), 2137–2143. doi:10.1016/j.procbio.2011.08.014.
- Zenebon, O., Pascuet, N. S., Tiglea, P., Lutz, A., Zenebon, O., Pascuet, N. S., Tiglea, P., Lutz, V., Maier-Lutz, I. Pascuet, N., Toledo, H, Rocha, B., Kussumi, T., Lemes,

R., 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. Instituto Adolfo Lutz – IAL, São Paulo.

Zheng, L., Yu, X., Wei, C., Qiu, L., Yu, C., Xing, Q., Fan, Y., Deng, Z., 2019. Production and characterization of a novel alkaline protease from a newly isolated *Neurospora crassa* through solid-state fermentation. LWT, 122, 108990. doi:10.1016/j.lwt.2019.108990.

Figures legends

Figure 1. Elution profile from DEAE-Sephadex anion exchange chromatography. The marks show the fractions containing the protease activity.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purification (Fold)	Recovery (%)
Crude extract	500	89.8	59	1	100
Cetonic precipitate	465	30	125	2.11	93
DEAE-Sephadex	136	0.95	242	4.09	27
Superdex 75	256	1.16	352	5.94	51

Figure 2. Elution profile from Superdex 75 FPLC system. a) First run: Chromatogram containing varied peaks of protein with the protease peak pointed out. b) Second run: Isolated fraction containing the peak of protease found in a).

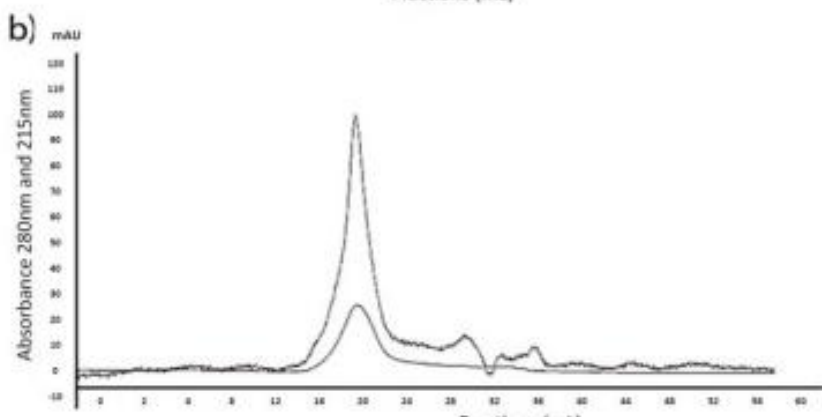
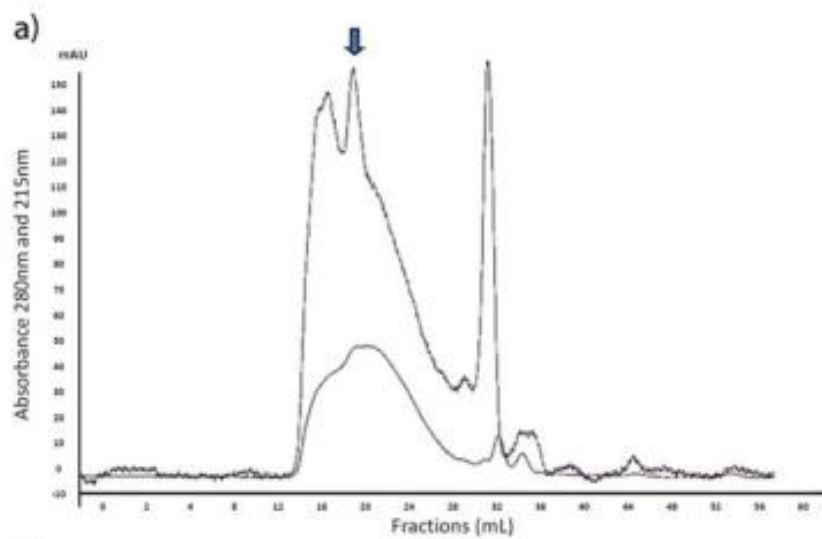
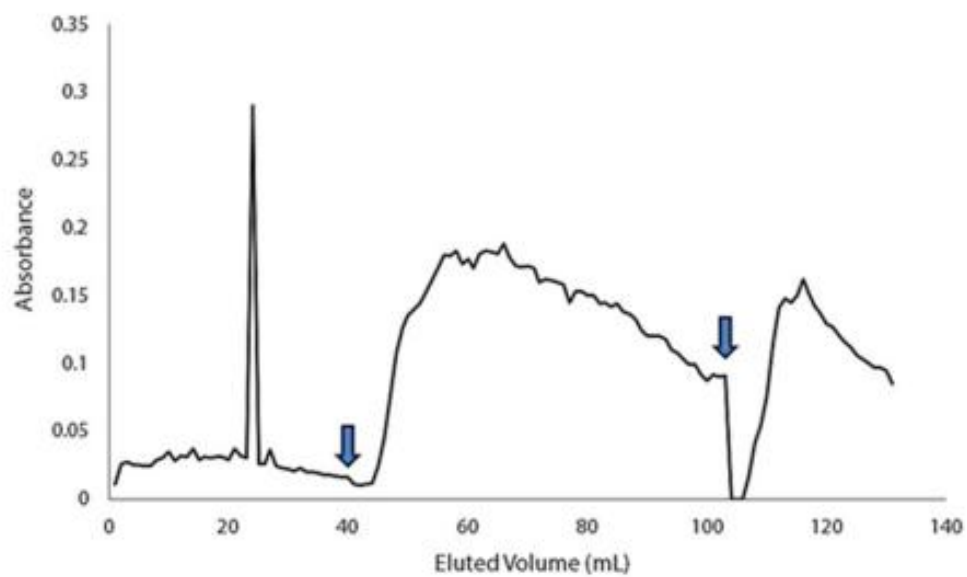


Figure 3. SDS-PAGE (10%) image of enzyme produced and purified from *Aspergillus sydowii* by FPLC system. (A) Molecular markers; (B) Enzyme purified under reducing conditions in presence of DTT; (C) Enzyme purified under reducing conditions in presence of β -mercapto ethanol; (D) Enzyme purified under non- reducing conditions. The standard proteins ($\times$) used to calculate the linear regression: ribonuclease A (13.7kDa), carbonic anhydrase (29kDa), ovalbumin (43kDa), conalbumin (75kDa), aldolase (158kDa), ferritin (440kDa), and thyroglobulin (669kDa). The molecular mass of purified enzyme was calculated from the standard curve.

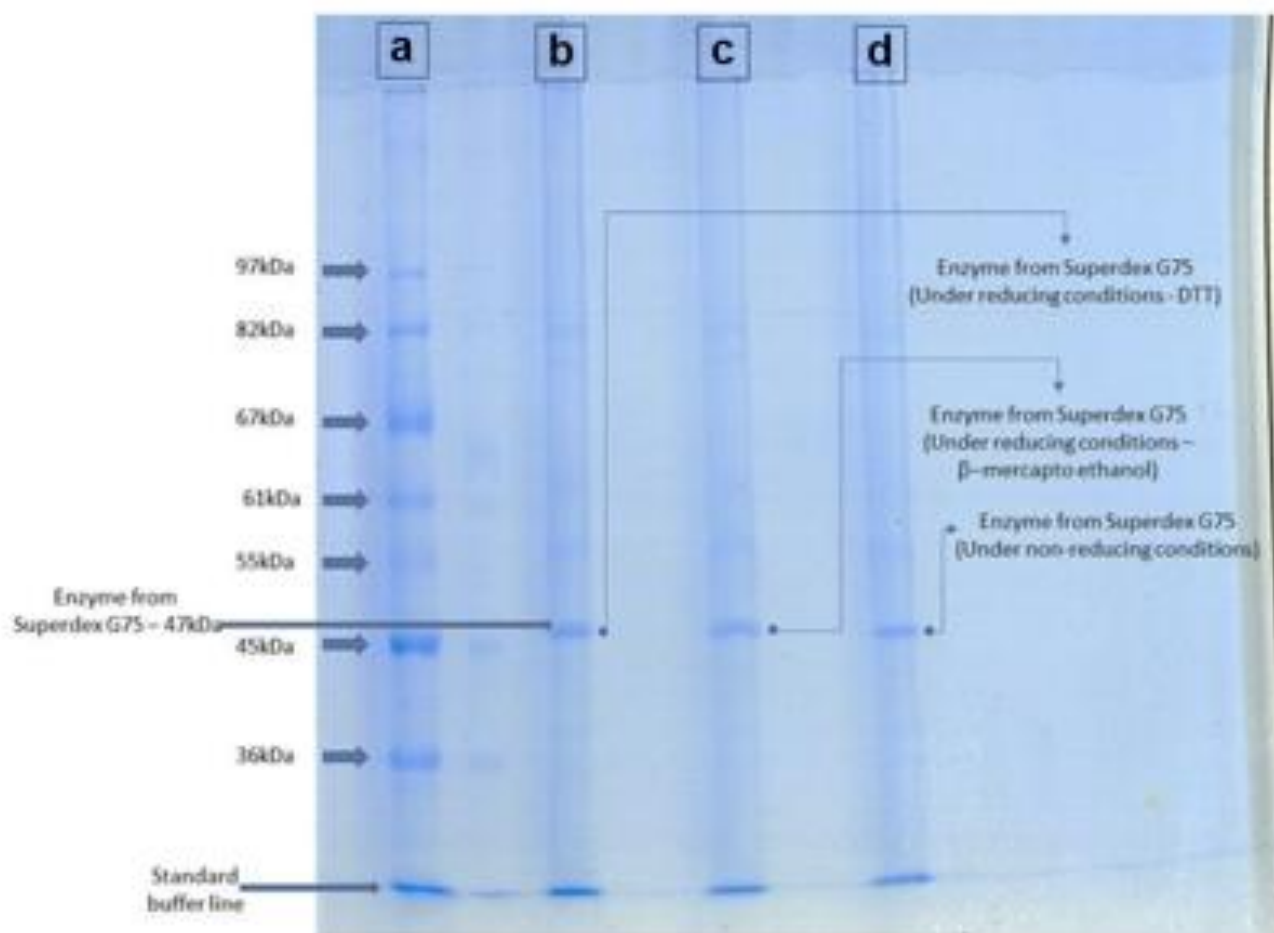
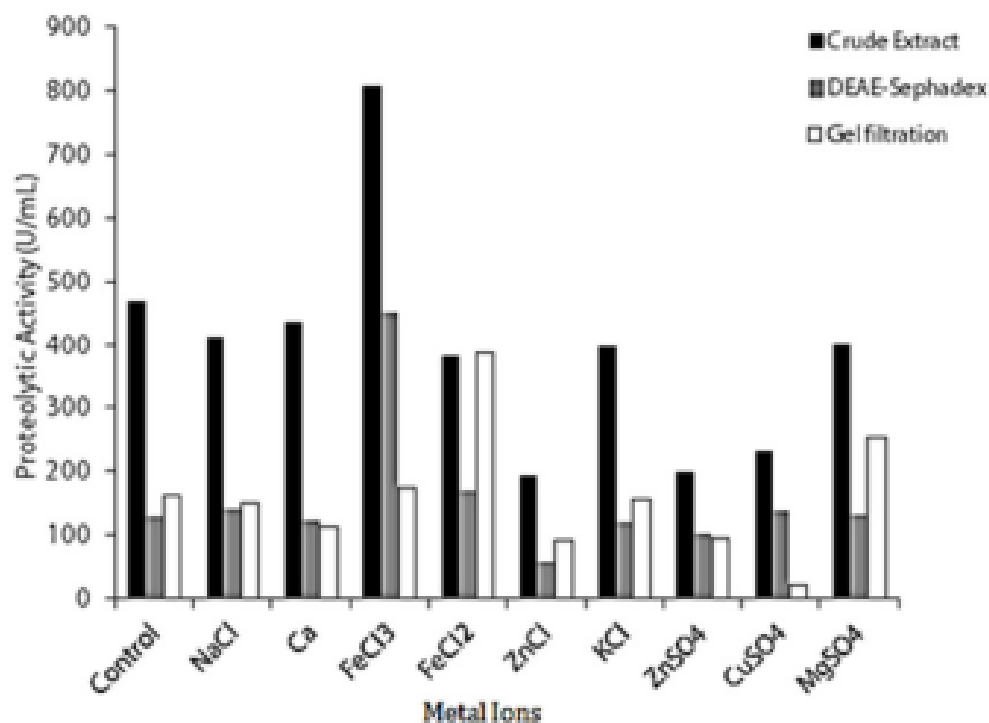


Figure 4. Effect of metal ions and inhibitors on the protease activity. Protease assays were carried out using purified protease (0.75 μ g).



Type of inhibitor	Percentual of residual activity (%)
Enzyme control	100
Pepstatin A	100
Iodoacetic acid	44
EDTA	10
PMSF	0
Triton-X100	28

Figure 5. Effect of on the optimal pH for protease activity. Optimum pH (a) and pH stability (b) of the crude and purified extracts. Protease assays were carried out using purified protease (0.75µg).

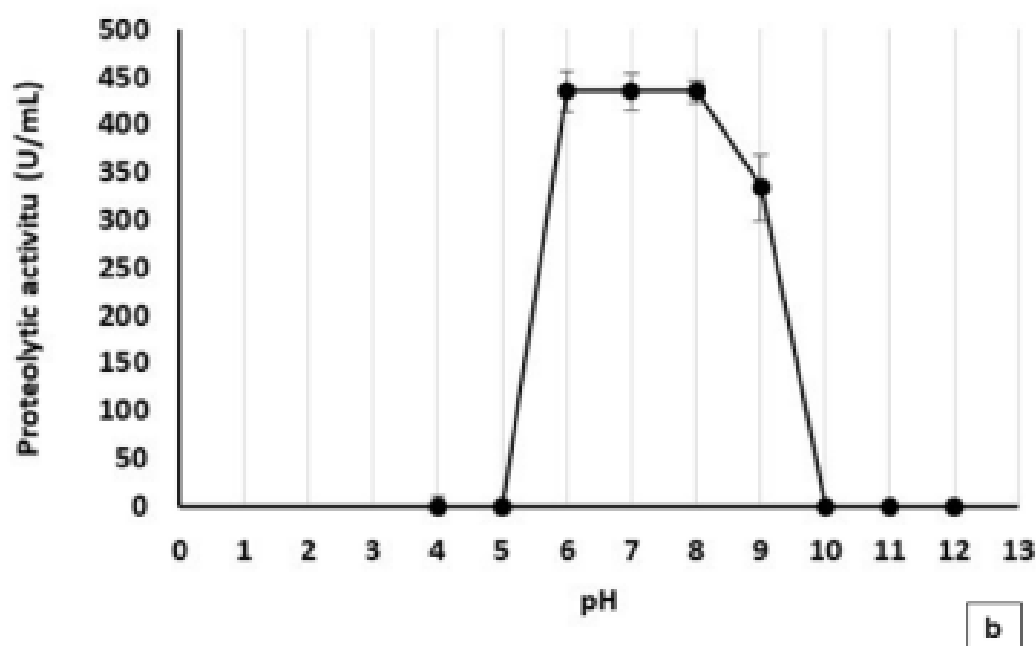
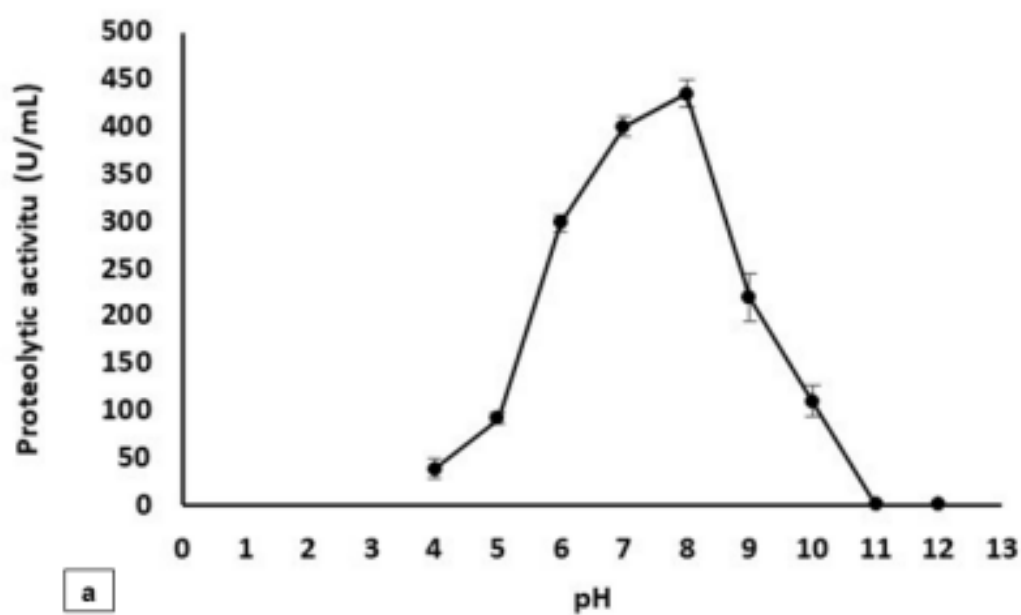
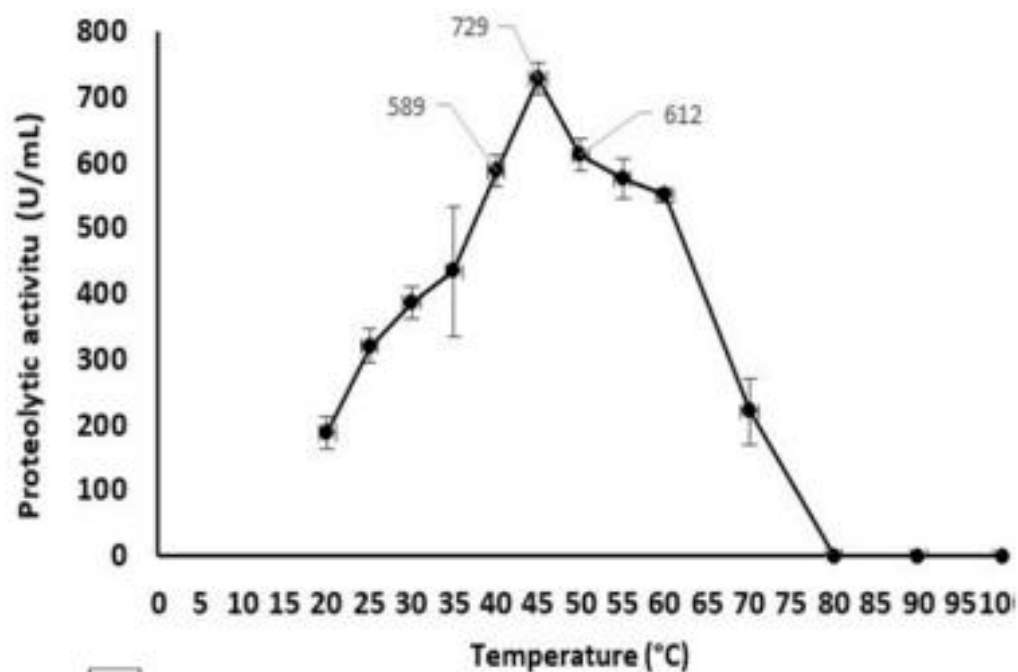
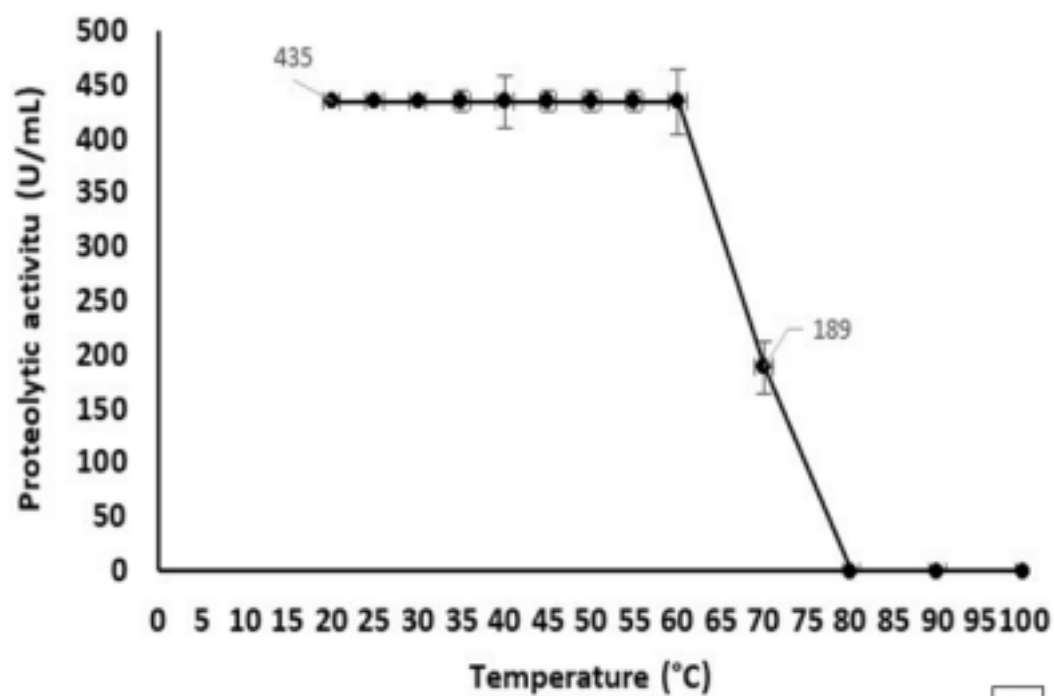


Figure 6. Optimum temperature (a) and temperature stability (b) of the crude and purified extracts. Protease assays were carried out using purified protease (0.75 μ g).



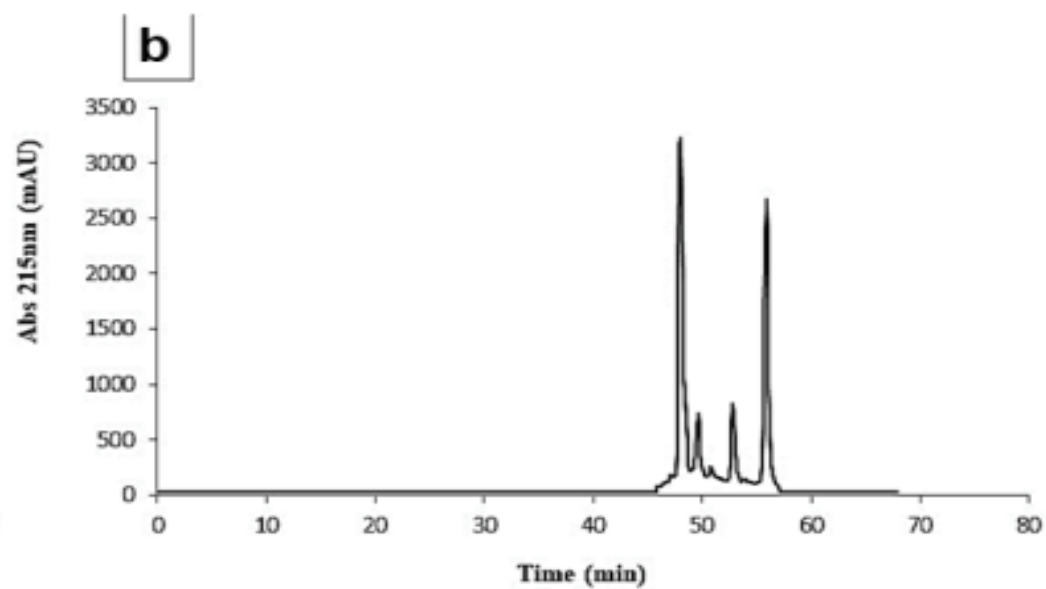
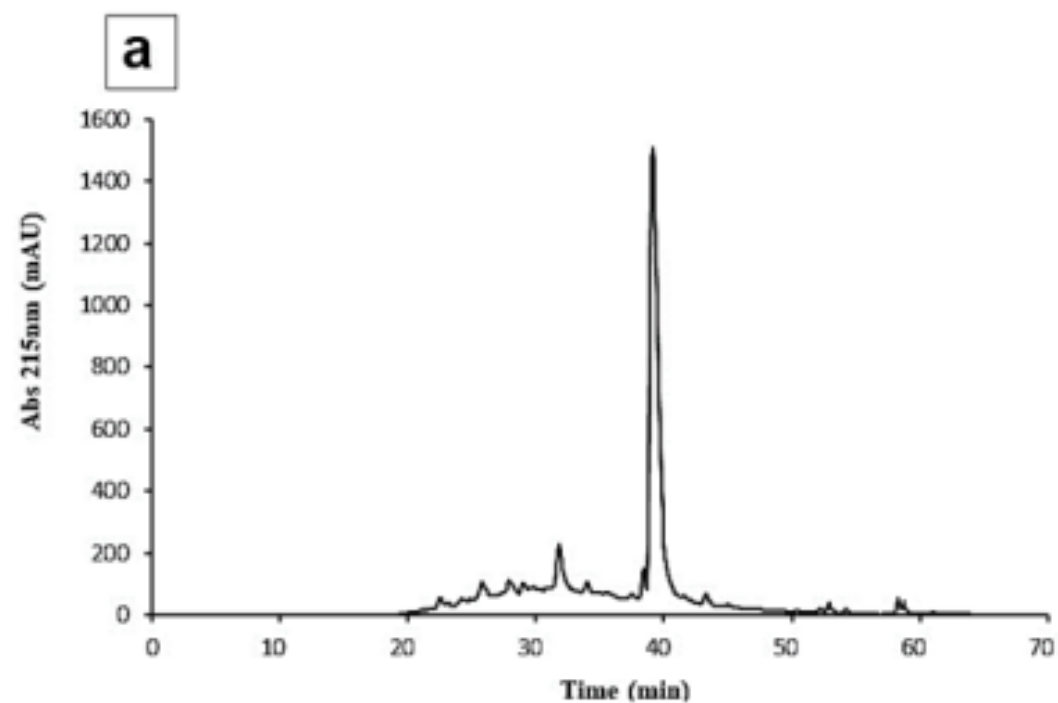
a



b

Figure 7. HPLC chromatogram profile of azocasein degradation process using a protease purified from *A. sydowii*. (A) HPLC profile of Azocasein purchased from Sigma;

(B) HPLC profile of Azocasein hydrolysis using a protease purified through the optimum parameters.



APÊNDICE B - ARTIGO PUBLICADO EM ANAIS

ALVES, Y.L., ROCHA, F.T.B., BRANDÃO-COSTA, R.M.P., PORTO, A.L.F. PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO. CONADIS v.1 ISSN: 2526-186X Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/63812>



PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus* spp. ATRAVÉS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

Ywkelly de Lima Alves¹
 Felype Thomaz de Brito Rocha²
 Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa³
 Ana Lucia Figueredo Porto⁴

INTRODUÇÃO

A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo, entretanto, o setor agroindustrial e de alimentos os produzem em quantidades elevadas. Esses resíduos podem apresentar problemas de disposição final e potencial poluente, além de representarem perdas de biomassa e de nutrientes. E o Brasil, por ter sua economia voltada para o agronegócio, gera quantias consideráveis desses resíduos. Portanto, se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais ou matérias-primas de baixo custo para outros processos, tais como os biotecnológicos, agregando valor aos resíduos (PEREIRA, 2014; ZEN *et al.*, 2014; LIMA, 2019).

Uma das aplicações dos resíduos pode ser a sua utilização como substrato para fermentações em estado sólido para a produção de enzimas. A fermentação em estado sólido (FES) permite o uso de uma variedade de produtos agrícolas e substratos não tradicionais, e se caracteriza pela presença de uma matriz sólida que exige pouca quantidade de água para estabelecer o crescimento fúngico. Além disso, exige meios de cultura simples com baixo risco de contaminação, reduz os efluentes líquidos a tratar, tem a extração das enzimas facilitada pela alta concentração de produtos e baixa demanda no uso de energia. A FES se apresenta como um caminho alternativo para os resíduos gerados e desempenha um papel de destaque no aproveitamento desses e, em virtude do crescimento microbiano, ocorre a síntese de diversos compostos de grande interesse para segmentos industriais. O fator primordial desta fermentação é a utilização de fungos filamentosos (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2016; ORLANDELLI, 2012).

Os fungos filamentosos são microrganismos que apresentam grande facilidade de cultivo, elevados níveis de produção enzimática e que secretam um grande número de enzimas extracelulares com elevado potencial para inúmeras aplicações industriais e biotecnológicas (NASCIMENTO *et al.*, 2014). O gênero *Aspergillus* se destaca entre os

APÊNDICE C – CAPÍTULO DE LIVRO

ROCHA, Felype Thomaz de Brito; OLIVEIRA, Vagner de Melo; BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa; PORTO, Ana Lúcia Figueiredo. DESCARTES DO RESTAURANTE UNIVERSITÁRIO DA UFRPE PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus sydowii* SIS 25 ISOLADO DA BORRA DE CAFÉ. In: ALMEIDA, Irene Maria Silva ... [et al.], (org.). Resíduos sólidos: gestão e tecnologia. 1. Ed. Recife: EDUFRPE. p. 233-246. Disponível em: www.epersol.online

2.4 DESCARTES DO RESTAURANTE UNIVERSITÁRIO DA UFRPE PARA PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR *Aspergillus sydowii* SIS 25 ISOLADO DA BORRA DE CAFÉ

ROCHA, Felype Thomaz de Brito

Universidade Federal de Pernambuco - UFPE
ftb.rocha@gmail.com

OLIVEIRA, Vagne de Melo

Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE
vagne_melo@hotmail.com

BRANDÃO-COSTA, Romero Marcos Pedrosa

Universidade de Pernambuco - UPE
romero_brandao@yahoo.com.br

PORTO, Ana Lúcia Figueiredo

UFRPE
analuporto@yahoo.com.br

RESUMO

Agro-resíduos estão difundidos por todo país e vem gerando problemas ambientais, uma vez que eles acabam sendo eliminados no ambiente sem a condição adequada de descarte causando assim danos ambientais sérios. Nos ambientes urbanos estes resíduos vem principalmente de restaurantes universitários (RU), sendo um plano de gestão estratégica para lidar com a situação crítica. Hoje, os principais resíduos gerados pelo RU-UFRPE são: óleo de cozinha, cascas de verduras e hortaliças, sobra dos preparos e borra de café. Os resíduos de café possuem potencial para uso biotecnológico. Assim, este trabalho objetivou aproveitar os resíduos de café do RU-UFRPE, como forma sustentável de produzir enzimas por *Aspergillus sydowii* SIS 25, usando a fermentação em estado sólido (FES). *A. sydowii* SIS 25 foi capaz de produzir 0,318 mg/mL de material proteico, com atividade proteásica de 412,0 U/mL. A protease foi purificada e caracterizada parcialmente. Este é o primeiro relato desse tipo de atividade fermentada por *Aspergillus sydowii* SIS 25, empregando o resíduo de café como substrato. A partir dos dados aqui descritos, torna-se um desafio a utilização biotecnológica e consciente dos resíduos de café, o tornando matéria-prima renovável, viável e de baixo custo para geração um produto de alto valor, como enzimas proteolíticas.

PALAVRAS-CHAVE: Café, Protease, Substrato

APÊNDICE D - RESUMO EXPANDIDO

OLIVEIRA, V.M.; ASSIS, C.R.D.; SILVA, J.C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.;

SILVA, Q.J.; BEZERRA, R.S.; PORTO, A.L.F. **COLÁGENO DE PELE DE PEIXE: ISOLAMENTO, BIOQUÍMICA E APLICAÇÕES**. In: V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

Colágeno de Pele De Peixe: Isolamento, Bioquímica E Aplicações

Vagne de Melo Oliveira¹, Caio Rodrigo Dias Assis², Sabrina Roberta Santana da Silva¹, Felype Thomas de Brito Rocha¹, Jessica Costa da Silva¹, Quesia Jemima da Silva¹, Ranilson de Souza Bezerra², Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

²Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências.
vagne_melo@hotmail.com

Resumo

Pele de peixes pode ser utilizada no tratamento de queimaduras e em processo de regeneração de órgãos. Dela é possível extrair o colágeno, uma proteína fibrosa de alto valor comercial. Assim, este trabalho objetivou isolar o colágeno da pele de *Cichla ocellaris* empregando pepsina comercial (PSC) e definir suas propriedades bioquímicas. A pele foi removida e tratada para o isolamento do colágeno, definido no SDS-PAGE. Uma cadeia compacta tripla helicoidal estabilizada por ligações de hidrogênio (analisadas por FTIR) caracterizou-a como tipo I. Além disso, o PSC mostrou alta absorção no espectro de ultravioleta (211nm), corroborando que a proteína é colágeno tipo I e também mostrou alta taxas de solubilidade em diferentes concentrações de NaCl (0 a 3%), bem como em meio de pH ácido. Nossos resultados indicam a viabilidade de uso do colágeno PSC de *C. ocellaris*, bem como o seu potencial para aplicações biotecnológicas, como na indústria biomédica.

Palavras chave: cicatrização, proteínas, regeneração tecidual.

SILVA, J.C.; SILVA. Q.J.; ROCHA, F.T.B.; SILVA. S.R.S.; OLIVEIRA, V.M.; PORTO, A.L.F. **BIOQUÍMICA DO COLÁGENO E SUA UTILIZAÇÃO PELA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS UMA BREVE REVISÃO**. In: V Simpósio De Morfologia E Fisiologia Animal, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

Bioquímica do Colágeno e Sua Utilização pela Indústria de Alimentos – Uma Breve Revisão

Jessica Costa da Silva^{1,2}, Quesia Jemima da Silva², Felype Thomas de Brito Rocha², Sabrina Roberta Santana da Silva², Vagne de Melo Oliveira², Ana Lúcia Figueiredo Porto²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

²Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

jess.cost15@gmail.com

Resumo

O colágeno é uma proteína de origem animal, cuja função no organismo é contribuir com a integridade estrutural dos tecidos em que está presente. Esta proteína é encontrada nos tecidos conjuntivos do corpo, tais como os ossos, tendões, cartilagens, veias, pele, dentes, bem como nos músculos e na camada córnea dos olhos. Em termos de quantidade, é o composto mais importante do tecido conjuntivo e é um elemento estrutural importante em organismos multicelulares. Devido a sua abundância, principalmente na composição de resíduos de animais, como peles, carcaças, entre outros, essa substância tem sido isolada e utilizada pela indústria de alimentos, no intuito de enriquecer nutricionalmente o produto, assim como também baratear os custos de produção, devido à utilização quase total do animal. Desta forma, este trabalho objetivou realizar uma breve revisão sobre a bioquímica do colágeno e sua aplicação na indústria de alimentos.

Palavras chave: alimento funcional, colágeno, proteínas.

OLIVEIRA, V.M.; SILVA, J. C.; ROCHA, F.T.B.; SILVA. S.R.S.: SILVA. Q. J.:

NASCIMENTO, T. P.; PORTO, T.S-. P. **POTENCIAL FIBRINOLÍTICO DE**

RESÍDUOS DO PESCADO. IN: V SIMPOSIO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA

ANIMAL, 2018, Recife. Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018.

Potencial Fibrinolítico De Resíduos Do Pescado

Vagne de Melo Oliveira¹, Sabrina Roberta Santana da Silva¹, Thiago Pajeú Nascimento¹, Felype Thomas de Brito Rocha¹, Jessica Costa da Silva¹, Quesia Jemima da Silva¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.

vagne_melo@hotmail.com

Resumo

Biomoléculas extraídas do processamento do pescado podem ser utilizadas no segmento industrial e farmacêutico após sucessivos processos de purificação. Assim, este trabalho objetivou determinar a atividade fibrinolítica de resíduos intestinais de resíduos do processamento do pescado (Foram utilizadas 16 espécies de peixes e 1 de camarão marinho, a saber: *Astronotus ocellatus*, *Anisotremus virginicus*, *Cichla ocellaris*, *Colossoma macropomum*, *Oreochromis niloticus*, *Lebranche mullet*, *Centropomus undecimalis*, *Sparisoma axillare*, *Eucinostomus gula*, *Rachycentron canadum*, *Caranx crysos*, *Lutjanus synagris*, *Scomberomorus mackerel*, *Parachromis managuensis*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Cynoscion leiarchus* e *Litopenaeus vannamei*) para atuarem como fonte alternativa para a indústria farmacêutica. Os resultados indicaram o hidrolisado de *L. vannamei* ($56,16 \pm 0,15$ U/mL) embora todos os demais extratos também apresentaram atividade com capacidade de serem melhor exploradas pela indústria através de novos bioprocessos, visando sua potencialidade no uso efeito de tratamento de doenças cardiovasculares.

Palavras chave: protease, biotecnologia, medicina, veterinária.

SILVA, J.C.; SILVA, Q.J.; ROCHA, F.T.B.; SILVA, S.R.S.; SANTOS, S.L.; PORTO, A.L.F.; CAVALCANTI, M.T.H.; OLIVEIRA, V.M. EXTRAÇÃO DE COLAGENASE DE PEIXES NEOTROPICAIS E SEU POTENCIAL FISIOLÓGICO. In: V Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018, Anais do Simpósio de Morfologia e Fisiologia Animal, 2018

Extração De Colagenase De Peixes Neotropicais e Seu Potencial Fisiológico

Jessica Costa da Silva^{1,2}, Steliane Lima Santos², Felype Thomas de Brito Rocha², Quesia Jemima da Silva², Sabrina Roberta Santana da Silva², Ana Lúcia Figueiredo Porto², Maria Taciana Holanda Cavalcanti², Vagne de Melo Oliveira²

¹Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências.

²Universidade Federal de Rural de Pernambuco, Laboratório de Tecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Morfologia e Fisiologia animal.
jess.cost15@gmail.com

Resumo

Colagenases são proteases que fazem parte de um grupo de enzimas de importância vital do ponto de vista fisiológico, atuando na manutenção e regeneração de órgãos e tecidos. Este trabalho objetivou determinar a atividade da colagenase de peixes durante a aula prática de bioquímica do curso de engenharia de pesca/UFRPE e descrever sua potencialidade na fisiologia da catrização. Para tanto, foram utilizados vísceras intestinais de *Caranx bartholomaei*, *Trachinotus carolinus*, *Astronotus ocellatus*, *Colossoma macropomum*, *Oreochromis niloticus* e *Sarotherodon*. Os resíduos foram processados para a preparação do extrato bruto e dosagens enzimáticas. Dentre as espécies citadas acima, o *Astronotus ocellatus* foi a que apresentou maior atividade ($200 \pm 0,01$ U/mg), sugerindo a potencialidade da espécie para aplicações no segmento médico após sucessivas etapas de purificação para obtenção da enzima livre de interferentes. Assim, fontes alternativas de colagenases são de interesse do mercado, reduzindo a carga poluidora, agregando valor e impulsionando a economia.

Palavras chave: biotecnologia, colágeno, enzima, resíduos.

APÊNDICE E - PARTICIPAÇÃO DE EVENTOS CIENTÍFICOS

Participante ouvinte do SEMINÁRIO DE BIOCONTROLE 2020 – IPA/UFRPE, realizado pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco e pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2020



Participante ouvinte do Minicurso 2 – Encapsulamento de bioativos para o biocontrole que ocorreu durante o SEMINÁRIO DE BIOCONTROLE 2020 – IPA/UFRPE, realizado pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco e pela Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2020

Acesse <https://doity.com.br/validar-certificado> para verificar se este certificado é válido. Código de validação: 0P0RZPH



Participante ouvinte do II SIMTERBIO & I International Biotechnology Webinar promovido pelo Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2020



Participante ouvinte do “Minicurso 1 – Inovação Tecnologia: Introdução à Patentes” que ocorreu durante o II SIMTERBIO & I International Biotechnology Webinar promovido pelo Laboratório de Tecnologia de Bioativos – LABTECBIO da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2020



Participante ouvinte do “Minicurso: Elaboração de Revisão Sistemática e Metanálise” realizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2019



Anexos I – Regras para publicação da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências.

Preparação de manuscritos

Todas as seções do manuscrito devem possuir espaçamento duplo. Após o aceite, nenhuma mudança será feita no artigo, de modo que as provas de prelo precisem apenas de correções em erros tipográficos. Lembramos que o envio de artigos é feito exclusivamente pelos autores através do nosso sistema de gerenciamento de artigos.

Tamanho do artigo

Os artigos podem ser de qualquer tamanho necessário para a apresentação e discussão concisa dos dados, mas mantendo-se conciso e cuidadosamente preparado tanto em termos de impacto quanto de legibilidade. No entanto, artigos não devem exceder 50 páginas, incluindo todos os itens (figuras, tabelas,

referências, etc.), a menos que possua autorização prévia do Editor-Chefe.

Página de rosto

A página de rosto do artigo deve apresentar os seguintes itens: **1.** Título do artigo com até 150 caracteres, sem abreviações e com a tentativa de manter o interesse amplo da comunidade científica; **2.** Nomes completos de todos os autores. Utilize números sobrescritos para indicar a filiação de cada autor. **3.** Endereços profissionais e ORCID de todos os autores, incluindo instituição, departamento, rua, número, CEP, cidade, estado e país; **4.** Key words (de 4 a 6 em ordem alfabética e separadas por vírgulas); **5.** Running title (versão resumida – e não abreviada - do título com até 50 caracteres, incluindo espaços); **6.** Seção dos AABC à qual o artigo pertence; **7.** Nome, endereço, telefone e e-mail do autor para correspondência, a quem serão enviadas as mensagens mais relevantes do processo de avaliação. Este autor ou autora deve ser indicado com um asterisco após seu nome.

Não cumprir com qualquer dos requisitos acima fará com que o artigo seja devolvido (*unsubmitted*) para correções.

Abstract

O abstract deve conter até 200 palavras e apresentar as principais descobertas do artigo, incluindo uma breve introdução, os objetivos do trabalho e uma conclusão baseada nas presentes descobertas. Caso os autores estejam submetendo uma revisão convidada/autorizada, o abstract deve abordar o principal tema da revisão e explicitar a contribuição de tal revisão à área. O abstract não deve possuir títulos nem citações/referências.

Texto do manuscrito

Todo o texto deve ser escrito com espaçamento duplo utilizando a fonte Times New Roman tamanho 12 ou equivalente, desde que mantida a legibilidade. Por favor, organize seu texto nas seguintes partes sempre que possível: **1.** Página de rosto; **2.** Abstract (em página separada, 200 palavras ou menos, sem abreviações); **3.** Introduction; **4.** Materials and Methods; **5.** Results; **6.** Discussion; **7.** Acknowledgments, se aplicável; **8.** Author contributions (se o artigo tiver mais de um autor); **9.** References; **10.** Legendas de

figuras e tabelas, se aplicável.

Artigos de algumas áreas, como por exemplo Ciências Matemáticas, devem seguir seu formato padrão. Em alguns casos, pode ser aconselhável omitir a seção (4) e juntar as partes (5) e (6). Quando aplicável, a seção Materials and Methods deve indicar o Comitê de Ética que avaliou os procedimentos para estudos em seres humanos ou as normas seguidas para tratamentos experimentais em animais.

Todos os procedimentos devem ser detalhadamente descritos. Utilize inglês norte-americano para escrever o texto. Nomenclaturas da área de Química devem ser fornecidos de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC). Cepas de organismos também devem estar identificadas. Informe nomes de fornecedores de reagentes e/ou equipamentos. Utilize unidades e símbolos de acordo com o Bureau International des Poids et Mesures (SI) sempre que possível.

Acknowledgments

Devem ser incluídos ao fim do texto, antes das referências. Agradecimentos pessoais devem preceder nomes de instituições e agências. De forma ideal, notas de rodapé devem ser evitadas, mas, quando necessário, devem estar numeradas. Agradecimentos a financiamentos, subsídios, bolsas de estudo e dívidas com outros colegas, bem como menções à origem do artigo (como uma tese, por exemplo), devem estar nesta seção. Favor incluir o nome completo da agência de fomento, país e número do projeto (se aplicável).

Abreviações

Devem ser definidas em sua primeira ocorrência no texto, exceto por abreviações padrão e oficiais. Unidades e seus símbolos devem estar em conformidade com as aprovadas pelo Bureau International des Poids et Mesures (SI).

Legendas de figuras

Esta informação deve ser fornecida ao fim do manuscrito, após as referências. Todas as figuras devem conter legenda. A legenda deve possuir uma sentença introdutória que descreve as principais descobertas. Todas as divisões na figura devem ser identificadas com letras minúsculas, quando aplicável (1a, 2a, 2b, 3c, 3d, etc.). Quando for o caso da utilização de barras de erro, favor informar se um

número que vem após o símbolo $\pm$ é um Standard Error Of Mean (SEM) ou standard deviation of mean (SD). Deve ser informado na legenda se o resultado apresentado representa N experimentos individuais.

Tabelas

Cada tabela deve possuir um pequeno título acima da mesma. Notas abaixo da tabelas também pode ser utilizadas. Tabelas devem ser citadas no artigo em algarismos romanos (Table I, Table II, Tables IV and V, etc.). Tabelas devem ser submetidas separadamente em arquivos editáveis, preferencialmente .doc ou .docx.

Figuras

Só serão aceitas figuras de alta qualidade (mínimo de 300 dpi). Todas as ilustrações serão consideradas figuras, incluindo desenhos, gráficos, mapas, fotografias, esquemas, etc. Seu posicionamento tentativo deve ser indicado, assim como todas as figuras devem ser citadas com seu respectivo número ao longo do texto. Figuras devem ser enviadas de acordo com as seguintes especificações: **1.** Desenhos e ilustrações devem estar em formato .PS/.EPS ou .CDR (PostScript ou Corel Draw) e nunca inseridas no texto; **2.** Imagens ou figuras em escala de cinza devem estar em formato .TIF e nunca inseridas no texto; **3.** Cada figura deve ser enviada em arquivo separado; **4.** Figuras devem, a princípio, ser submetidas no tamanho em que espera-se que estejam publicadas no periódico, ou seja, largura de 8cm (uma coluna) ou 16,2cm (duas colunas), com a altura máxima de cada figura e respectiva legenda sendo menor ou igual a 22cm.

As legendas das figuras devem ser enviadas com espaçamento duplo em página separada. Cada dimensão linear dos menores caracteres e símbolos não pode ser menor que 2mm após redução. Figuras coloridas são aceitas tanto como figuras em preto e branco. No entanto, 5 figuras em p/b são sem custo aos autores, enquanto cada figura colorida na versão impressa será cobrada dos autores, com a comunicação sendo feita durante a fase de produção (após o processo de avaliação). De modo a padronizar a contagem e cobrança de figuras preto e branco, tabelas que ocupem dois terços da página ou que tenham mais que 12 colunas ou 24 colunas serão consideradas figuras p/b. Manuscritos de Matemática, Física ou

Química podem ser redigidos em TEX, AMS-TEX ou LaTeX, desde que o arquivo .BIB seja enviado junto. Manuscritos sem fórmulas podem ser enviados em .RTF ou doc/docx para Windows.

Referências

Os autores são responsáveis pela exatidão das referências, bem como suas respectivas citações. Artigos publicados ou ainda 'In press' podem ser incluídos. Comunicações pessoais (Smith, personal communication) devem ser autorizadas por escritos pelos envolvidos. Referências a teses, abstracts de encontros (não publicados em jornais indexados) e manuscritos em preparação ou apenas submetidos, mas não ainda aceitos, devem ser citados no texto no formato (Smith et al., unpublished data) e NÃO devem ser incluídos na lista de referências.

Referências devem ser citadas no texto no formato a seguir sem a aspa simples, 'Smith 2004', 'Smith & Wesson 2005' ou, quando há 3 ou mais autores, 'Smith et al. 2006'. Quando houver dois ou mais artigos cujo nome do primeiro autor e ano de publicação são idênticos, as referências devem ser diferenciadas por letras minúsculas, como em 'Smith 2004a', 'Smith 2004b', etc.

As referências devem ser listadas alfabeticamente de acordo com o nome do primeiro autor, sempre na ordem SOBRENOME XY, sendo X e Y as iniciais. Se há mais de 10 autores na referência, usar SOBRENOME XY ET AL., sem listar os demais autores. Referências devem conter também o título do artigo. Os nomes dos periódicos devem estar abreviados sem itálico, pontos ou vírgulas. Para as abreviações corretas, verifique listas das maiores bases de dados nas quais o periódico está indexado, ou consulte a World List of Scientific Periodicals. A abreviação a ser usada em referências dos Anais da Academia Brasileira de Ciências é **An Acad Bras Cienc**. Os seguintes exemplos devem servir de guias para sua lista de referências em nossa revista:

REFERENCES

ALBE-FESSARD D, CONDES-LARA M, SANDERSON P & LEVANTE A. 1984a. Tentative explanation of the special role played by the areas of paleospinothalamic projection in patients with deafferentation pain syndromes. *Adv Pain Res Ther* 6:

167-182.

ALBE-FESSARD D, SANDERSON P, CONDES-LARA M, DELAND-SHEER E, GIUFFRIDA R & CESARO P. 1984b. Utilisation de la depression envahissante de Leão pour l'étude de relations entre structures centrales. An Acad Bras Cienc 56: 371-383.

KNOWLES RG & MONCADA S. 1994. Nitric oxide synthases in mammals. Biochem J 298: 249-258.

PINTO ID & SANGUINETTI YT. 1984. Mesozoic Ostracode Genus Theriosynoecum Branson, 1936 and validity of related Genera. An Acad Bras Cienc 56: 207-215.

Livros e capítulos de livros

DAVIES M. 1947. An outline of the development of Science. Thinker's Library, n. 120. London: Watts, 214 p.

PREHN RT. 1964. Role of immunity in biology of cancer. In: NATIONAL CANCER CONFERENCE, 5., Philadelphia. Proceedings ... , Philadelphia: J. B. Lippincott, p. 97-104.

UYTENBOGAARDT W & BURKE EAJ. 1971. Tables for microscopic identification of minerals, 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 430 p.

WOODY RW. 1974. Studies of theoretical circular dichroism of polipeptides: contributions of B-turns. In: BLOUTS ER ET AL. (Eds), Peptides, polypeptides and proteins, New York: J Wiley & Sons, New York, USA, p. 338-350.