



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISILOGIA ANIMAL

PATYANNE CARVALHO CORREIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DA CAATINGA DE
PERNAMBUCO**

RECIFE- PE

2017

PATYANNE CARVALHO CORREIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DA CAATINGA DE
PERNAMBUCO**

Tese apresentada à Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Dr^a Tatiana Souza Porto

Coorientadora: Dr^a Ana Lúcia Figueiredo
Porto

Coorientador: Dr. Romero Marcos Brandão
Costa

RECIFE- PE

2017

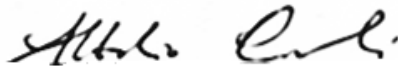
PATYANNE CARVALHO CORREIA

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE PROTEASES PRODUZIDAS POR
FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DE SOLOS DA CAATINGA DE
PERNAMBUCO**

Aprovada em 24 de Fevereiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

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



Prof. Dr. Attilio Converti
Università degli Studi di Genova –UNIGE



Prof Dr. Bruno Severo Gomes
(Universidade Federal de Pernambuco - UFPE)

Prof^a. Dr^a Galba Maria de Campos Takaki
(Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP)



Prof^a. Dr^a. Maria Taciana Cavalcanti Vieira Soares
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Aos meus pais Análdes Pinheiro e Roseberto Santos “in memoriam”, que me ensinaram a importância da família e exemplos de dignidade e persistência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu realizar este trabalho e me dá força a cada dia para continuar.

À minha orientadora Prof^ª. Tatiana Souza Porto, pelos ensinamentos que muito contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos meus queridos coorientadores, Prof^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto, pela orientação, confiança, apoio irrestrito, além de ser um exemplo de dedicação à ciência e pessoa. Grata por ter me dado a oportunidade e me acolhido no grupo. E meu coorientador Prof. Dr. Romero Brandão, pela dedicação, incentivo, ensinamentos, paciência e amizade todo momento.

A Prof^ª Teresa Petersen por abrir as portas do laboratório para realização dos experimentos.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Biotecnologia (LABTECBIO): que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente: Amanda Sales, Eliziane Pereira, Juanize Matias, Meire Falcão, Thiago Pajeú, Felipe, Wendell Albuquerque, Catarina Michelli, que estiveram presentes, auxiliando, incentivando e compartilhando as conquistas.

Agradeço a todos os professores, colegas e funcionários da pós-graduação em biociência animal.

A CAPES pelo financiamento do projetos do SISBIOTA/CNPq/FACEPE.

A UFRPE e a Universidade de Aalborg pela concessão do espaço para desenvolvimento do trabalho científico.

À minha amada mãe, Anaíldes Pinheiro obrigada pelo exemplo de caráter e dignidade, pelo carinho, apoio, confiança e paciência, em todos os momentos de minha vida.

Aos meus irmãos, Pãmmela e Petherson pelo apoio e incentivo, bem como a todos os meus familiares.

Ao meu namorado, Elmo Júnior que esteve me apoiando e estimulando cada vez que eu precisei.

À minha amiga Priscilla Sales que esteve presente desde o início desta empreitada e juntas com conseguimos conquistar mais esta etapa acadêmica.

E aos meus amigos Annie Elise, Pedro Arthur, Isabela Oliveira, Emanuel Filho e Ana Patrícia que mesmo a distância mantiveram o contato e a amizade.

RESUMO

O presente estudo objetivou avaliar a produção, purificação e caracterização de proteases produzidas por fungos filamentosos isolados da Caatinga. Foram previamente utilizados 32, sendo selecionada a linhagem com maior produção de proteases em condições de cultivo em frascos agitados utilizando planejamento fatorial 2^3 , foi avaliada influência das variáveis independentes: concentração de glicose, concentração de soja e pH. Com base nos resultados obtidos na fermentação em frascos agitados foi realizado em biorreator tipo tanque agitado de 1,5L, avaliando a influência das variáveis independentes: velocidade de agitação e aeração na produção da protease. O líquido metabólico resultante das fermentações foi utilizado nas etapas de purificação utilizando o sistema de duas fases aquosas (SDFA), métodos cromatográficos por troca iônica e gel filtração. Uma segunda protease com atividade fibrinolítica, foi utilizada e foram analisadas as propriedades em termos de coagulação, estabilidade da enzima na presença de solventes orgânicos e estrutural em diferentes pH, e atividade fibrinogenolítica. Em frascos agitados a produção máxima de protease (69,77 U/mL) foi obtida pH 6,0, 0,5% de glicose e 3% de soja, enquanto em biorreator nas condições de agitação e aeração iguais à 450 rpm e 0,5 vvm, a atividade máxima de protease foi de 61,19 U/mL após 72h de cultivo. A protease revelou uma temperatura ótima de 50°C e valores de atividade cerca de 75% quando incubada por 3h a 20, 30 e 40°C, respectivamente. A atividade enzimática foi fracamente inibida pelos íons metálicos $ZnSO_4$ e $CuSO_4$ e por fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), sugerindo ser uma serino protease. A protease foi parcialmente purificada a partir do sistema 24% (m/m) polietilenoglicol (PEG) 400 e 20% (m/m) citrato em pH 6, o que assegurou um fator de purificação de 1.6 e 146% de recuperação, na fase rica em (PEG). Associado o sistema a cromatografia por troca iônica e gel filtração foi possível alcançar uma purificação de 8 e rendimento de 12,5%. Quando analisado o efeito da protease fibrinolítica sobre o tempo de coagulação, observou-se no tempo de tromboelastina parcial ativada (TTPa) um efeito prolongado com o passar do tempo, sugerindo uma inibição da via intrínseca. Com relação ao tempo de protrombina (TP), esse foi menos sensível a variação do tempo, mesmo em concentração enzimática elevada. A protease fibrinolítica apresentou-se mais estável na presença do solvente acetato de etila e menos estável na presença de etanol. Quando foi avaliada a atividade fibrinogenolítica ocorreu uma ação preferencial da protease fibrinolítica sobre as cadeias A α e B β . A protease fibrinolítica apresentou uma desordem estrutural a valores extremos de pH. As duas enzimas fúngicas estudadas apresentam potencial para aplicação na indústria biotecnológica.

Palavras-chave: Caatinga, proteases fúngicas, purificação.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the production, purification and characterization of proteases produced by filamentous fungi isolated from Caatinga. 32 strains of filamentous fungi were previously selected from the best protease producer and the best culture conditions for the microorganisms were determined in shake flasks using a factorial design 2^3 , the influence of the independent variables were evaluated: glucose and soy concentrations, and pH on proteinase activity. Based on the obtained results from the fermentation in shake flasks, a factorial design 2^2 was performed in a bioreactor type stirred tank of 1.5L to verify the influence of the independent variables: agitation and aeration in the protease production. The resulting metabolic liquid from the fermentation was used in the following purification steps using aqueous two phases system (ATPS) and chromatographic methods. Another protease with fibrinolytic activity was studied and properties analyzed: effect on coagulation, stability with solvents and the structure on different pH and fibrinolytic activity. The maximum protease production (69.77 U/ml) for shake flasks was obtained under the following conditions: 6.0 of pH, glucose 0.5% and soy 3%. On stirred-tank bioreactor maximum protease activity it was obtained 61.19 U/mL after 72 h of cultivation, under conditions of agitation and aeration at 450 rpm and 0.5 vvm. The protease characterization revealed that the optimum temperature of the enzyme was 50 °C and the activity was 75% when incubated for 3 hours at 20, 30 and 40 °C. The enzyme activity was slightly inhibited by metal ions ($ZnSO_4$ and $CuSO_4$) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), indicating to be a serine protease. The enzyme was partially purified by 24% (w/w) PEG 400 and 20% (w/w) citrate system, at pH 6 the proteases preferably partitioned to the top phase, resulting in 146% recovery and a 1.6-fold increase in specific activity. The ATPS combined with varied chromatography methods reached 8 fold purified and a 12.5% recovery. The fibrinolytic protease on coagulation time was analyzed, a prolonged effect over time was observed in the activated partial thromboplastin time (APTT), indicating an inhibition of intrinsic pathway coagulation and the prothrombin time (PT) was less sensitive to time variation, even at high enzymatic concentration. The fibrinolytic protease was more stable in the presence of ethyl acetate solvents and less stable in the presence of ethanol. When fibrinolytic activity was evaluated, a preferential action of the fibrinolytic protease on the A α and B β chains occurred. The fibrinolytic protease presented a structural disorder at pH scales with higher acidity and alkalinity. The two fungal enzymes studied present potential for application in the biotechnology industry.

Keywords: Caatinga, proteases, purification.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – grau Celsius

ANOVA- Análise de Variância

ANVISA-Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCC -Business Communications Company

BSA- Albumina de soro Bovino

CP-Coefficiente de Partição

CTI – Cromatografia de troca iônica

EC- Comissão internacional de enzimas.

EDTA- Ácido etilenodiaminotetra-acético

FP- Fator de purificação

FES - Fermentação em Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

GRAS - Generally Recognized as Safe

IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular)

kDa- Quilodaltons

MDIC - Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços

MEROPS- Banco de dados online sobre proteases.

PEG- Polietilenoglicol

PMSF- Fluoreto de metilfenilsulfonil.

PPG – Polipropilenoglicol

SDFA- Sistema de Duas Fases Aquosas

SDS- Dodecil sulfato de sódio.

TP- Tempo de protrombina

TTPa- Tempo de tromboplastina parcialmente ativada

UCP- Universidade Católica de Pernambuco

vvm-Volume de ar por volume de meio, por minuto

Y- Recuperação

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Desenho esquemático de um biorreator STR com agitação mecânica.....26

Capítulo I - Scale up production of protease using *Aspergillus tamarii* UCP 1279

Fig 1. Screening for proteolytic activity of protease produced by filamentous fungi in soybean medium after 72h of submerged fermentation.....57

Fig 2. Curves of biomass, glucose consumption, and protease production by *Aspergillus tamarii* UCP 1279 cultivated in bioreactor at 0.5% glucose, pH 6.0, and 3% soybean concentration.....62

Fig 3. Effect of temperature (A) and pH (B) on the activity and stability of protease from *Aspergillus tamarii* UCP1279.....63

Fig 4. Stability of the proteases of *Aspergillus tamarii* UCP 1279 in the presence of various commercial detergents.66

Fig 5. Lineweaver-Burk plot of protease from *Aspergillus tamarii* UCP 1279.66

Capítulo II - Integration of an aqueous two-phase system with varied chromatographic methods to the partial purification of a protease produced by *Aspergillus tamari* UCP 1279.

Fig 1. Electrophoretic analysis of protease from *Aspergillus tamarii* for molecular weight determination: (A) lane 1: mass market proteins. (b) lane 2: crude extract, (C) partially purified protease after the aqueous two phase extraction.....79

Fig 2. Chromatographic profile of a protease from *Aspergillus tamarii* UCP 1279. Anion exchange chromatography was performed using a DEAE-A-50 column equilibrated with 0.1 Tris-HCl buffer (pH 8) and eluted with NaCl solution (0.3 and 0.6 M as the chromatogram peaks80

Fig 2. (A) Elution profile for ion-exchange chromatography of protease on a HiTrap DEAE-FF column (5x1 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted by 0.3 M NaCl; (B) gel filtration chromatography on Superdex 75 (30x10 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCLA buffer (pH 8.0) supplemented with 0.15M NaCl.81

Capítulo III – Aplicação de uma enzima fibrinolítica e sua análise estrutural

- Figura 1.** Hidrólise do fibrinogênio pela protease fibrinolítica em função do tempo. A- Controle, 0, 1, 3,5 e 10 minutos; B – 20, 30, 60 e 90 minutos; C – 120, 150, 180 e 240 minutos. Durante os intervalos de tempo as amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12%.94
- Figura 2.** Efeito de vários solventes orgânicos na estabilidade da enzima a 25 ° C e 4° C, com 0 dias (A) e com 30 dias (B). Cada valor representa a média de três ensaios.97
- Figura 3.** A - Atividade anticoagulante da enzima. O tempo de coagulação do sangue foi medido pelo tempo de trombina parcial ativa (TTPa) e B - Tempo de protrombina (TP).99
- Figura 4.** Estabilidade da protease fibrinolítica em diferentes temperaturas (4 e 25°C ao longo de um ano. 100
- Figura 5.** Espectro de dicroísmo circular obtido para protease fibrinolítica a diferentes. 102

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1. Proteases produzidas por diferentes espécies de fungos filamentosos, sua caracterização e aplicações.	22
Tabela 2. Classificação das técnicas cromatográficas.	31

Capítulo I- Scale up production of protease using *Aspergillus tamaraii* UCP 1279

Table 1. Levels of the independent variables studied according a 23 full factorial design for protease production by <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279.	54
Table 2. Levels of the independent variables studied according to a 22 complete factorial design for protease production in bioreactor.	54
Table 3. Protease production by <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279 in shaker flasks using the 23 factorial design outlined in Table 1.	58
Table 4. Statistical analysis of the effect of variables and their interactions on protease activity by <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279.	59
Table 5. Production of proteases by <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279 in bioreactor according to a 22 factorial design.	61
Table 6. Statistical analysis of the effects variables and their interactions on protease activity by <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP1279 in bioreactor.	61
Table 7. Effect of metal ions on the residual activity of protease from <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279.	64
Table 8. Effect of inhibitors on the residual activity of protease from <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279.	64
Table 9. Effect of surfactants on relative activity of protease from <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279 in different time (min).	65

Capítulo II- Integration of an aqueous two-phase system with varied chromatographic methods to the partial purification of a protease produced by *Aspergillus tamaraii* UCP 1279.

Table 1. Successive purification steps of protease from <i>Aspergillus tamaraii</i> UCP 1279.	78
---	----

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE TABELAS	11
SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Proteases	19
2.1.1 Proteases produzidas por micro-organismos	20
2.1.2 Aplicações industriais das proteases	22
2.2 Processos fermentativos.....	25
2.2.1 Fermentação em biorreatores	26
2.3 Métodos de purificação de proteínas.....	28
2.3.1 Sistema de duas fases aquosas (SDFa).....	28
2.3.2 Aplicação dos sistemas de duas fases aquosas	29
2.4 Purificação de proteínas por cromatografia.....	30
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
4 OBJETIVOS.....	49
4.1 Objetivo Geral:.....	49

4.2	Objetivos Específicos:	49
CAPÍTULO I.....		50
ABSTRACT.....		51
1	INDRODUCTION	51
2	MATERIAL AND METHODS.....	53
2.1	Microorganism	53
2.2	Screening for protease production by submerged fermentation	53
2.3	Production of protease using factorial design in shaker flask	53
2.4	Production of protease on Stirred-tank Bioreactor	54
2.5	Protease activity assay	54
2.6	Protein content determination	55
2.7	Glucose concentration.....	55
2.8	Determination of biomass concentration	55
2.9	Effect of pH on protease activity and stability	55
2.10	Effect of temperature on protease activity and stability	55
2.11	Effect of metal ions on the protease activity	55
2.12	Effect of inhibitors on protease activity	56
2.13	Effect of surfactants on the enzyme stability and compatibility with commercial detergents.....	56
2.14	Kinetics parameters of protease activity.....	56
3	RESULTS AND DISCUSSION	57
3.1	Screening for protease production	57

3.2	Production of protease on stirred-tank bioreactor using factorial design.....	60
3.3	Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability	62
3.4	Effect of Metal Ions and inhibitors on Protease Activity	63
3.5	Effect of Inhibitors on ProteaseActivity.....	64
3.6	Effect of surfactant.....	65
3.7	Kinetics parameters of the protease activity	66
4	CONCLUSION.....	67
5	ACKNOWLEDGMENTS	67
6	REFERENCES.....	67
	CAPITULO II	73
	ABSTRACT.....	74
1	INTRODUCTION.....	75
2	MATERIAL AND METHODS.....	76
2.1	Microorganism and Crude extract	76
2.2	Purification steps	76
2.2.1	Aqueous two-phase systems	76
2.2.2	Enzyme purification by ion-exchange chromatography	76
2.2.3	Gel filtration chromatography	77
2.3	Electrophoresis and protein staining.....	77
2.4	Protein Determination	77
2.5	Protease Activity Assay	78
3	RESULTS AND DISCUSSION	78

3.1	Protease extraction in aqueous two-phase system.....	78
3.2	Ion exchange chromatography	79
3.3	Gel filtration chromatography.....	80
3.4	Efficiency of the ATPS association with chromatographic methods.....	81
4	CONCLUSION.....	82
5	ACKNOWLEDGMENTS	82
6	REFERENCES.....	82
	CAPÍTULO III.....	86
	RESUMO	87
1	INTRODUÇÃO	88
2	MATERIAIS E MÉTODOS	88
2.1	Enzima fibrinolítica	88
2.2	Determinação da atividade fibrinolítica	89
2.3	Atividade fibrinogenolítica.....	89
2.4	Efeitos da albumina sérica na atividade enzimática.	89
2.5	Influência de solventes orgânicos sobre a atividade da enzima fibrinolítica e sua estabilidade.	90
2.6	Tempo de prateleira da enzima fibrinolítica	90
2.7	Ensaio de Espectroscopia de fluorescência de estado estacionário	90
2.8	Dicroísmo circular.....	91
2.9	Determinação dos tempos de coagulação.....	91
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	92

3.1	Atividade fibrinogenolítica.....	92
3.2	Efeitos da albumina sérica na atividade enzimática.	95
3.3	Influência de solventes orgânicos sobre a atividade da enzima fibrinolítica e sua estabilidade.	95
3.4	Determinação dos tempos de coagulação.....	98
3.5	Tempo de prateleira.....	100
3.6	Dicroísmo Circular	101
4	CONCLUSÃO	103
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	103
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
7	ANEXOS.....	108

1 INTRODUÇÃO

Proteases E.C. (3.4), também denominadas de proteinases ou peptidases, são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas em proteínas e peptídeos. Tais proteases são fisiologicamente necessárias para todos os organismos vivos, sendo encontradas em uma ampla variedade de fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. As proteases formam um complexo grupo de enzimas, que varia em suas características físico-químicas e catalíticas (RODARTE et al., 2011).

Do ponto de vista científico e comercial proteases provenientes de micro-organismos são preferidas em relação às de plantas e de animais, por apresentarem características como velocidade de síntese, estabilidade e rendimento elevado de substrato em produto, além de necessitarem de pequeno tempo de geração, requerendo espaço limitado para cultivo, e ser de fácil manipulação genética, além de gerar enzimas com melhores propriedades (RAO et al., 1998; ABIDI et al, 2013). Dentre os micro-organismos, os fungos são mais comumente utilizados na prática industrial, pois possuem capacidade de liberação de enzimas extracelulares em concentração elevada e facilidade de recuperação a partir do caldo fermentado (ZAFERANLOO et al., 2014).

Importantes no campo comercial, as proteases são enzimas multifuncionais e respondem por quase 60% do mercado de enzimas, sendo utilizadas frequentemente em indústrias de detergentes, de couro, produtos farmacêuticos, alimentos e biotecnologia (YIN et al, 2013; SOARES DE CASTRO et al., 2014).

A nutrição e o ambiente físico podem ser um fator dominante para o crescimento fúngico e para os níveis de produção de proteases extracelulares em sistemas de cultura submersa, esses podendo ser realizados desde escala laboratorial em frascos agitados até escala industrial utilizando biorreatores (LU et al., 2010). O sucesso de uma fermentação vai depender das condições da formação de biomassa e produto, para isso é essencial conhecimento ideal de produção, parâmetros, tais como temperatura, pH, grau de agitação, força de cisalhamento e a concentração de oxigênio, sendo algumas dessas variáveis monitoradas exclusivamente em escala industrial, tornado-se de suma importância o uso de biorreatores (SOCCOL, PANDEY, LARROCHE, 2013).

Durante o processo fermentativo para produção de enzimas, compostos indesejados podem ser gerados, dificultando seu uso nos processos industriais. O desenvolvimento de

métodos para a separação e purificação de proteínas tem sido um importante pré-requisito para muitos dos avanços da indústria de biotecnologia (MALPIEDI et al., 2009).

Procedimentos tradicionais, incluindo precipitações orgânicas e com sais, filtração, diálise e cromatografia ou uma combinação destes tornam-se onerosos, consomem tempo e apresentam dificuldade para o escalonamento. Além disso, dependendo do tipo de uso e da biomolécula, o número excessivo de etapas poderá comprometer o processo de recuperação e aumentar o custo final da produção (GURPILHARES et al., 2015).

Nesse contexto, o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) enquadra-se como uma técnica de pré-purificação alternativa aos métodos convencionais. A técnica de extração líquido-líquido tem sido usada na recuperação primária e purificação parcial de grande variedade de produtos biológicos. (RITO-POLOMARES, 2004). O SDFA tem sido aplicado na separação de biomoléculas devido a sua agilidade de manuseio, eficiência e baixo custo. Os sistemas podem ser formados por dois polímeros ou polímero e sal (PERÉS et al., 2015). Os sistemas PEG/sal têm sido introduzidos na prática de separação de proteínas em larga-escala, devido a maior diferença de densidade entre as fases, baixa viscosidade, diminuição dos tempos de processamento e aumento da produtividade e rendimentos, o que resulta na diminuição dos custos (NASCIMENTO et al., 2010; SOARES et al., 2015).

Considerando nichos de atuação e o uso de enzimas em diferentes seguimentos industriais, este trabalho teve como objetivo produzir proteases utilizando fungos filamentosos por meio de processos fermentativos, purificar, caracterizar e investigar seu potencial de aplicação na indústria de medicamentos e detergentes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Proteases

As proteases (E.C. 3.4) (ou peptidases, sinônimo recomendado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular), constituem uma classe de hidrolases que catalisam ligações peptídicas de proteínas em peptídeos.). As peptidases estão presentes em todos os organismos vivos, desempenhando diversas funções a nível fisiológico. Sua principal função biológica é a hidrólise de proteínas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e transporte de proteínas através de membrana (KLOBITZ, 2008; RAWLINGS et al., 2010).

Existem dois sistemas principais de classificação das peptidases: o sistema da Comissão de Nomenclatura Enzimática (EC) da IUBMB (União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) e o sistema MEROPS (banco de dados com informações para peptidases e seus inibidores). Segundo o sistema EC do IUBMB, as enzimas são classificadas em seis grandes grupos (Classes) de acordo com o tipo de reação que catalisam a massa molecular e com suas propriedades elétricas. São elas: serino protease (ex: tripsina e elastase), serino protease II (ex: subtilisina), cisteíno protease (ex: papaína), aspártico protease (ex: pepsina, quimosina), metalo protease (ex: carboxipeptidases bovina) e metalo protease I (ex: carboxipeptidase bovina) e metalo protease II (ex: termolisina). As serino proteases e as metalo proteases se subdividem em duas famílias, as proteases de mamíferos e as proteases microbianas. Ainda de acordo com sistema EC, as peptidases estão incluídas na subclasse 3.4, estando distribuídas por 14 sub-subclasses e podem ser classificadas em dois grandes grupos de acordo com o modo de ação: exo-peptidases (EC 3.4.11 a 3.4.19), que atuam na extremidade da cadeia polipeptídica, na região N ou C terminal e endo-peptidases (EC 3.4.21 a 3.4.24 e EC 3.4.99), que agem nas ligações no interior da cadeia proteica, entre as regiões N- e C-terminal. Estas formam um complexo grupo de enzimas, que variam enormemente em suas características físico-químicas e catalíticas (RAO et al 1998; BEYNON; BOND 2001; KLOBITZ, 2008). As proteases apresentam especificidade de substrato e possuem resíduos de aminoácidos característicos no seu sítio ativo envolvidos na ligação peptídica a ser hidrolisada em proximidade deles (BRIX; STOCKER, 2013).

No sistema MEROPS, cada peptidase é atribuída a uma família com base estatística nas semelhanças significativas em sua sequência de aminoácidos e as famílias, por sua vez, são agrupadas em clã com base nas semelhanças estruturais (RAWLINGS et al., 2010). O sistema

de classificação MEROPS leva em conta, não só o mecanismo catalítico, como também as relações evolutivas, a sequência de aminoácidos e as características estruturais essenciais. Cada família e clã tem um identificador que mostra o tipo catalítico das peptidases do grupo: A (ácido aspártico), C (cisteíno), M (metalo), S (serino), T (treonina), G (ácido glutâmico) e U (tipo catalítico desconhecido). Os clãs que incluem famílias de mais do que um tipo catalítico tem como identificador a letra P (RAWLINGS et al., 2010). As peptidases de ácido glutâmico não são reconhecidas pelo sistema EC, sendo apenas consideradas no sistema MEROPS.

Cerca de 50 famílias de proteases são atualmente classificadas pela base de dados MEROPS, incluindo quase um terço de todas as proteases já descritas (BI et al., 2011). Devido à sua importância comercial, muitas pesquisas vêm sendo realizadas sobre os aspectos bioquímicos e biotecnológicos das peptidases, incluindo as de origens animal, vegetal ou microbiana. Proteases originárias de animais são subprodutos da indústria de carne e requerem a espera do crescimento do animal, além da obrigatoriedade de abate para extração da enzima de interesse, o que torna sua obtenção dispendiosa (Rao et al., 1998). Proteases produzidas por plantas são bastante utilizadas, como papaína (DUBEY et al., 2007) e bromelina (BRESOLIN et al., 2013), com aplicações na área médica e na indústria de alimentos. As proteases vegetais requerem um processo de obtenção mais demorado, pois dependem da disponibilidade de área para cultivo e condições climáticas. Neste contexto, os micro-organismos são preferidos frente a outras fontes de proteases, por serem de rápido crescimento e requererem espaço limitado para cultivo (GERMANO et al., 2003).

As proteases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do total de enzimas vendidas no mundo, sendo líder no mercado de enzimas e importantes nos processos biotecnológicos (SAVITHA et al, 2011, LI et al., 2014).

2.1.1 Proteases produzidas por micro-organismos

Entre os micro-organismos, os fungos filamentosos têm atraído bastante atenção no desenvolvimento de novas pesquisas ambientais e nas indústrias na produção de enzimas e metabólitos, pois apresentam baixo custo dos meios de cultura utilizados associados a alta produtividade, rápida produção, facilidade de manipulação genética das linhagens, produção enzimática extracelular, o que contribui com a recuperação a partir do caldo fermentado (ANITHA; PALANIVELU, 2013).

Enzimas produzidas por fungos possuem vantagens quando comparadas às bacterianas, tais como a formação de micélios pelos fungos durante a fermentação que podem ser facilmente removidos por meio de filtração (SHANKAR et al.,2011), uma maior variedade, atividade num intervalo mais amplo de pH e maior especificidade para o substrato (RANI et al., 2012). Podem ser utilizadas em diferentes aplicações industriais, tais como na indústria de couro e detergentes (FEROZ KHAM, 2013; HAMMAMI ET AL, 2017).

O uso de fungos como produtores de enzima é mais seguro do que a utilização por bactérias, em específico fungos filamentosos uma vez que alguns são reconhecidos como GRAS (Generally Recognized as Safe) (ZAFANRELOO et al., 2014). Entre os fungos, os mais estudados são os do gênero *Aspergillus*, que possui mais de 260 espécies. Pertencem à uma grande família das Trichocomaceae, conhecida por apresentar impactos positivos, sendo utilizados na produção de alimentos e fármacos, (TACCONNE et al., 2015, MONTSERRAT et al., 2015).

Estudos com *Aspergillus* são realizados há séculos. Ainda assim, a sistemática deste gênero está em evolução, pois além das características morfológicas e da utilização das técnicas moleculares, as espécies podem ser caracterizadas por sua taxa de crescimento em determinadas temperaturas, atividade de água e seu crescimento em meio de cultura e por seu perfil metabólico secundário (SAMSON; VARGA, 2009). Novas espécies pertencentes a este gênero continuam sendo descobertas, como *Aspergillus caatingaensis* e *Aspergillus pernambucoensis*, isoladas do solo semiárido da Caatinga no Estado de Pernambuco no Brasil (MATSUZAWA et al., 2014).

Espécies do gênero *Aspergillus* apresentam variedade química vasto, possuindo importantes utilizações nas indústrias alimentícia, têxtil e farmacêutica. Altos impactos econômicos têm sido alcançados a partir da exploração de enzimas e ácidos produzidos por diversas espécies de *Aspergillus*. Como exemplos, podem ser citados importantes metabólitos produzidos atualmente em escala industrial através da produção por este gênero: a enzima amilase e os ácidos cítrico e glicônico (ACOURENE; AMMOUCHE, 2012; YADAV, 2015).

Espécies de fungos filamentos do gênero *Mucor* também apresentam-se com grande potencial para a produção biotecnológica de proteases e outras enzimas. Há relato de produtores de proteases aspárticas, conhecidas como renina (*Mucor circinelloides*), que podem ser utilizadas na coagulação do leite na indústria de queijo (GAMA SALGADO et al., 2013), na fabricação de produtos industriais como amilase (*Mucor racemosus*) (ALVES et al.,2002), na

produção de ácidos orgânicos (*Mucor piriformis*), e na hidrólise de fibrinogênio (fibrina) por (*Mucor subtilissimus*) (NASCIMENTO et al., 2016).

Vários trabalhos relataram diferentes espécies de fungos filamentosos como potenciais produtores de proteases, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Proteases produzidas por diferentes espécies de fungos filamentosos, sua caracterização e aplicações.

Espécie Fúngica	Substrato	Tempo de Produção (h)	Tipo de Enzima (Protease)	Temperatura Ótima (°C)	pH Ótimo	Autor
<i>Aspergillus nidulans</i>	Czapek	144	Alcalina	35	8,0	Charles et al. (2008)
<i>Aspergillus awamori</i>	farelo de trigo	96	Amilase	55	5,0	Negi e Banerjee (2009)
<i>Aspergillus flavipes</i>	farelo de trigo	144	Geral	90	8,0	Novelli, et al. (2016)
<i>Aspergillus flavus</i>	espiga de milho	48	Geral	40	11,0	Yadav et al. (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	farinha de peixe	96	Fibrinolítica	-	-	Sharkova et al., (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	farelo de soja	50	Geral	50	3,0	Soares de Castro et al. (2014)
<i>Aspergillus tamarii</i>	farelo de trigo	72	Queratinolítica	40	0	Silva et al. (2016)
<i>Aspergillus terreus</i>	Algodão	120	Geral	-	10,0	Niyoenzima e More (2015)
<i>Aspergillus versicolor</i>	farinha de peixe	96	Colagenolítica	-	-	Sharkova et al. (2015)
<i>Aspergillus ustus</i>	leite desnatado	144	Geral	45	9,0	Damare et al. (2006)
<i>Cordyceps militaris</i>		120	Fibrinolítica	37	7,4	kim et al., (2006)
<i>Mucor subtilissimus</i>	farinha de trigo	72	Fibrinolítica	37	-	Nascimento et al. (2016)
<i>Schizophyllum commune</i>		144	Fibrinolítica	50	8,0	Pandee et al.(2008)
<i>Tremella fuciformis</i>		-	Fibrinolítica	40	8,0	Choi et al. (2015)

2.1.2 Aplicações industriais das proteases

No mercado consumidor, as enzimas estão divididas em dois grandes segmentos: nas enzimas industriais (enzimas técnicas, destinadas à indústria do couro, produtos de limpeza, enzimas para propearação de bebidas e alimentos, bem como enriquecimento de rações animal) e enzimas especiais (enzimas dos segmentos terapêuticos, enzimas para diagnóstico) (SÁ-PEREIRA et al. 2008).

No cenário mundial para enzimas industriais é esperado um crescimento de 7,1 bilhões dólares até 2018 e 7,6 bilhões em 2020. Dentre as enzimas industriais, 75% são enzimas hidrolíticas, das quais dois terços são proteases, e espera-se um crescimento maior devido sua aplicação em produtos farmacêuticos, detergentes e químicos em vários países, incluindo China, Índia e Brasil. (SAVITHA et al., 2011; GRAND VIEW RESEARCH, 2014)

A crescente demanda por alimentos processados e o aumento da consciência de saúde nas pessoas está impulsionando a indústria de alimentos também no mercado de enzimas alimentares. Essas enzimas são um dos principais aditivos alimentares que convertem moléculas complexas em mais simples em nossa dieta. A demanda por alimentos processados e embalados está crescendo com a necessidade de garantir segurança alimentar. No entanto, devido à complexidade da cadeia de fornecimento global de alimentos, existe uma necessidade de acrescentar aditivos alimentares para manter o teor nutricional e a vida de prateleira. Um dos métodos é a utilização de enzimas alimentares, que podem contribuir também com a redução de custos e atuar evitando o desperdício de água e de energia. Na indústria de alimentos no Brasil, o mercado prevê que o valor deve chegar a 240 milhões reais, representando 11% do mercado mundial (ABIAM, 2015).

Na indústria alimentícia as enzimas são utilizadas na para redução de custos e melhoria da qualidade, dentre essas as proteases, carboidratases e lipases dominam o mercado. As enzimas alimentares encontram grande aplicação na panificação, laticínios e produtos congelados, amaciantes de carne e flavorizantes, na formulação de preparados infantis e no aumento da digestibilidade de alimentos, na síntese do adoçante aspartame, etc. A panificação representa o maior mercado, onde as enzimas são aplicadas para melhorar a estabilidade da massa e a vida de prateleira dos produtos finais. O aumento do uso de enzimas na transformação de queijo está impulsionando o uso de enzimas na indústria leiteira, que constitui o segundo maior mercado após a indústria de bebidas (DEMAIN; SANCHEZ, 2009; LLORENTE et al., 2015; MOHAMMADI et al, 2015).

Após os antibióticos as enzimas proteolíticas são os compostos mais abundantemente produzidos e utilizadas na indústria de cosméticos e farmacêutica. Proteases com atividade queratinolítica podem ser aplicas na eliminação de queratina na acne ou psoríase, degradação de pele queratinizada (BRANDELLI et al., 2010;. VIGNARDET et al., 2001). Em produtos cosméticos, proteases queratinolíticas podem hidrolisar as ligações peptídicas de queratina da pele, agem na remoção das células promovendo renovação das células mortas da epiderme e a restaurando-as. (SIM et al., 2000). Podem ser utilizadas também na remoção de cicatrizes

hipertróficas, terapias de queimados, composição de pomadas cicatrizantes (LIMA et al., 2014). Essas proteases quando associadas a antibióticos podem realizar um debridamento suave e seletivo facilitando o processo de cicatrização natural de ulcerações da pele, através da remoção eficiente do material necrosado, acelerando os processos de cura (PENG et al., 2005; MURAT et al., 2015).

Na indústria farmacêutica proteases com atividade fibrinolítica são tidas como agentes terapêuticos por terem a capacidade de degradar coágulos de fibrina formados dentro dos vasos sanguíneos, podendo ser utilizadas nos tratamentos de doenças cardiovasculares (SIMKHAD, et al. 2010). As doenças cardiovasculares têm sido uma das principais causas de morte no mundo de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 17,5 milhões de pessoas morrem por ano. Tendo em vista que os atuais medicamentos utilizados para terapia trombolítica (estreptoquinase, uroquinase, e estafiloquinase) apresentam efeitos colaterais e alto custo de produção essas proteases fibrinolíticas são tidas como possíveis substitutas terapêuticos. (ZHANG et al. 2007).

Proteases alcalinas produzidas por micro-organismos (bactérias, fungos e leveduras) são amplamente utilizadas na indústria de limpeza. Atualmente, o uso de detergentes a base de enzimas (protease) é preferido aos sintéticos convencionais, em virtude das suas propriedades de limpeza e melhor desempenho em baixa temperatura de lavagem (JOSEPHINE et al. 2012; SAVITHI, 2011; SOUZA, 2015; YADAV et al. 2015). Sua utilização em detergentes para roupa corresponde aproximadamente 25% do total de vendas mundiais de enzimas (DEMAIN; ADRIO, 2008).

Devido aos baixos rendimentos e altos custos de purificação de enzimas, as indústrias de detergentes utilizam enzimas não purificadas na formulação de detergentes (PAUL, 2014). A caracterização bioquímica das enzimas é importante para avaliar o seu potencial biotecnológico. O estudo das propriedades das proteases, tais como a especificidade ao substrato, as condições ótimas de pH e catalíticas dos perfis de temperatura e de estabilidade, pode ser utilizado para prever a aplicação bem-sucedida da enzima para indústrias ou processos (CASTRO e SATO, 2013; SOARES de CASTRO et al., 2014).

Para aplicação de proteases na indústria torna-se necessário o desenvolvimento de um eficiente processo de obtenção dessas enzimas, sendo de fundamental importância conhecer os vários parâmetros do processo fermentativo de produção (ALARGASAMY, LARROCHE e PANDEY, 2006).

2.2 Processos fermentativos

Processos fermentativos utilizando micro-organismos são realizados desde a antiguidade para a produção dos mais diversos produtos, na indústria de alimentos (leite, vinho, cerveja, soja), bem como na indústria química (etanol), farmacêutica (produção de medicamentos) e na agricultura (tratamento de resíduos) (NAJAFPOUR, 2007, ZIMMER et al., 2009). Na metade do século XIX, Luiz Pasteur identificou através do estudo da produção de produtos por micro-organismos os princípios da fermentação, a utilização de metabólitos primários e secundários de interesse ao homem produzidos durante as fermentações (NAJAFPOUR, 2007).

A produção de enzimas microbianas pode ser realizada em dois tipos de processos, classificados de acordo com a quantidade de água envolvida: fermentação submersa (FS), com presença de água livre e fermentação em estado sólido (FES), caracterizada como cultivo onde o micro-organismo se desenvolve sobre uma superfície sólida sem a presença de água livre, porém com umidade na faixa de 15 a 70% (SOLIS-PEREIRA et al., 1996; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Cada técnica, em particular, apresenta sua vantagem (PÉREZ-RODRÍGUEZ., 2014). Na FES, as condições de cultivo são mais parecidas com o habitat natural dos fungos filamentosos, com isto os fungos estão mais adaptados para crescer e excretar maior quantidade de enzimas. A concentração dos produtos após extração é maior que os obtidos no processo de fermentação submersa e gera menos resíduo líquido. FS apresenta vantagens em relação ao controle do processo e a facilidade de recuperação de enzimas extracelulares, uma vez que os nutrientes estão dissolvidos em água, e de separação entre o micélio e o produto final. Durante a fermentação o metabolismo do micro-organismo gera calor;, a quantidade de água em abundância presente nas fermentações submersas remove o calor controlando as variações de temperatura e oxigênio (BIESEBEKE et al., 2002, SUBRAMANIYAM ; VIMALA, 2012).

Durante o processo fermentativo, vários fatores precisam ser monitorados e/ou controlados, a saber: físicos (tempo, temperatura, atividade de água, pressão, velocidade de agitação e vazão de gases e líquidos), químicos (pH, acidez, sólidos solúveis e oxigênio dissolvido) e biológicos (medida de crescimento microbiano e medida de contaminação) (ABIDI et al., 2011).

O processo fermentativo pode ser realizado em diferentes escalas de produção, desde a de bancada, passando por piloto até chegar na escala industrial, com volumes de trabalho variados entre as diferentes escalas (biorreatores de escala laboratorial variam de 1,5 à 100

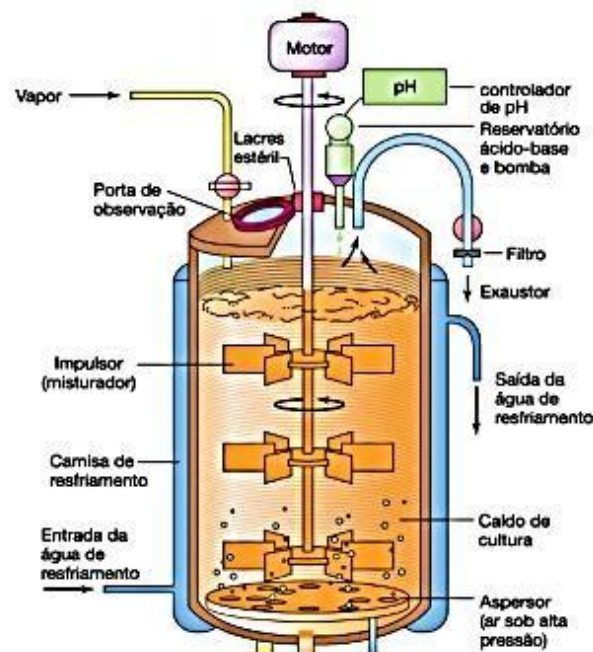
litros, mas durante operações em larga escala na indústria eles podem chegar a 100.000 litros). Processos fermentativos com fermentação submersa têm sido utilizados com sucesso para estudar a produção de enzimas fúngicas desde em frascos agitados até biorreatores (NEGI; BANEREJEE, 2006; SOUZA et al., 2015).

2.2.1 Fermentação em biorreatores

Industrialmente são utilizadas diferentes configurações de biorreatores em cultivos submersos, sendo a aplicabilidade de cada tipo de reator dependente do micro-organismo e do que se pretende produzir. Tradicionalmente, o tipo mais utilizado é o biorreator com agitação mecânica (Stirred Tank Reactor-STR), ilustrado na Figura 2.

Figura 1. Desenho esquemático de um biorreator STR com agitação mecânica.

(Fonte: MADIGAN, 2010).



A principal característica dos biorreatores com agitação mecânica é a presença de agitadores e chicanas que promovem a transferência de calor e de massa, e garantem a manutenção da homogeneidade do sistema, permitindo eficiência na mistura de substâncias, ruptura de bolhas de ar e dispersão de agregados celulares. Schmidell e Facciotti (2001) classificaram os biorreatores em dois grandes grupos: no primeiro grupo, as reações acontecem na ausência de células vivas (biorreatores enzimáticos) e no segundo grupo, as reações se

processam na presença de células vivas. Dentro desses grupos ainda há outra classificação quanto ao tipo de biocatalisador, à configuração do biocatalisador e a forma do meio reacional (CHISTI, 2002).

Muitos fatores podem contribuir para o comportamento dos micro-organismos no biorreator, apresentando características bastante distintas no que se refere aos fenômenos de transporte que ocorrem no reator (calor, massa e quantidade de movimento). Assim, por exemplo, reatores que operam com organismos unicelulares como bactérias e leveduras possuem, em geral, um comportamento reológico bastante distinto daqueles que empregam fungos filamentosos (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001, MUSONI et al., 2015).

A fermentação submersa em biorreatores de agitação mecânica utilizando fungos filamentosos apresenta importantes fatores que afetam o crescimento celular e formação do produto. Os componentes do meio, a taxa de agitação, a aeração e o pH são considerados e amplamente discutidos. A maioria dos estudos em biorreator relata a influência da agitação sobre a produção de metabólitos e enzimas. Os fungos filamentosos, contudo, são micro-organismos com diferentes morfologias e alguns apresentam formação de *pellets* ou de filamentos livres, tornando-se particularmente exigentes quanto à transferência de oxigênio durante o cultivo (ESPINOSA-ORTIZ et al., 2016).

A variação do pH também exerce influência sobre a morfologia fúngica. O pH do meio de cultura atua alterando as características eletrostáticas da superfície dos esporos. Em valores baixos (pH 2 e 3), a superfície dos esporos está protonada, o que promove sua dispersão e evita a formação dos pellets (floculação). Já em valores mais elevados de pH, entre 5,0 e 6,0, ocorre a aglomeração dos esporos, promovendo maior formação de pellets e otimizando as condições de crescimento e produção (WAINWRIGHT et al., 1993, LIBRA et al., 2003). Algumas vezes a morfologia do tipo pellet é preferida para cultivos industriais e para etapas de recuperação devido à menor viscosidade. Nesse tipo de cultivo a transferência de massa, oxigênio e nutrientes é consideravelmente melhor. A separação subsequente dos pellets do meio de cultivo é mais simples quando comparada com meios de cultivo micelares. Fácil agitação e aeração proporcionam baixo custo de operação uma vez que a carga energética necessária é menor (WUCHERPFENNIG et al., 2010).

Os processos pós-fermentação, também chamados *downstream*, visam recuperar as enzimas produzidas no caldo fermentado. As etapas de separação e purificação removem as substâncias tóxicas e/ou metabólitos indesejáveis. As células microbianas podem ser separadas por processo simples como filtração ou centrifugação e o caldo fermentado livre de células

poderá passar por etapas de purificação de acordo como o tipo de aplicação industrial (ORLANDELLI et al., 2012)

O custo de produção de enzimas está baseado principalmente nos processos de recuperação e tratamento do produto, sendo um dos pontos críticos da aplicação bem sucedida de proteases na indústria (HASHEM et al, 2015).

2.3 Métodos de purificação de proteínas

As etapas do processo de purificação de enzimas são muito importantes, pois elas necessitam de diferentes graus de pureza para serem utilizadas nas mais diferentes indústrias. Por serem solúveis em água, as enzimas precisam ser isoladas para serem reutilizadas e catalisar as reações em que serão aplicadas (BRADY ; JORDAAN, 2009; GARCIA-GALAN-et al., 2011). Por vezes pode ocorrer também a produção de um conjunto de proteínas semelhantes que apresentam atividade catalítica indesejada ou diminuem a especificidade do "biocatalisador" o que impede seu uso nos processos industriais. Portanto, para a utilização da biomolécula de interesse são necessárias estratégias de separação e purificação, como os sistemas de duas fases aquosas e métodos cromatográficos (IQBAL et al., 2016; MALPIEDI et al., 2009).

2.3.1 Sistema de duas fases aquosas (S DFA)

O método de extração líquido-líquido utilizando sistema de duas fases aquosas consiste na mistura de duas soluções aquosas imiscíveis que, em concentrações críticas, levam à formação de fases. O processo de purificação é o resultado de uma partição diferenciada da biomolécula de interesse e das impurezas entre as duas fases. De forma geral, esses sistemas são formados por uma solução aquosa de dois polímeros hidrofílicos (Polietileno glicol (PEG)/Dextrana) ou pela adição de um polímero e um sal (ex: PEG/(fosfatos/citratos/sulfatos) (NEVES et al., 2012). A distinção entre os dois tipos é feita de acordo com as substâncias a serem purificadas e também de acordo com as necessidades operacionais. Sistemas formados por polímeros/sal tendem a ser menos viscosos, facilitando a separação das fases, enquanto os demais podem ser aplicados a determinadas substâncias que não toleram a presença de sais em concentrações elevadas, que por sua vez apresentam também maiores dificuldades quanto à reciclagem ou descarte (MONTEIRO FILHO, 2010).

Os S DFA são bastante aplicados no campo da biotecnologia, pois apresentam baixo custo, elevado grau de separação e purificação de uma variedade de biomoléculas, inclusive de

células derivadas de plantas e animais, micro-organismos, fungos e os seus esporos, vírus, cloroplastos, mitocôndrias, proteína e ácidos nucleicos (PADILHA, 2010; FERREIRA, 2014).

O SDFA permite a separação e concentração simultânea da molécula de interesse para a aquisição de um extrato menos rico de impurezas. A característica mais importante desse sistema é apresentar um elevado teor de água de (cerca de 85-99%), em ambas as fases e tensão interfacial baixa, o que proporciona um ambiente biocompatível que facilita a preservação da atividade biológica no extrato enzimático (IANNUCCI et al., 2008). O uso de polímeros e sais no SDFA apresenta baixo custo econômico se comparado aos sistemas polímero-polímero (SOARES et al., 2015), além de favorecer a partição da proteína desejada para uma das fases do sistema através da variação nas condições de solução de sais e polímeros (MALPIEDI et al., 2009).

A partição em sistemas de duas fases aquosas depende não só das propriedades de superfície (tais como o tamanho da carga e hidrofobicidade) da enzima, mas das características físico-químicas das duas fases. A natureza do sistema é influenciada por fatores tais como tipo de polímeros, massa molar dos polímeros e sua concentração, o tipo de sal e a sua concentração, pH, força iônica e temperatura (PERICIN et al., 2009).

2.3.2 Aplicação dos sistemas de duas fases aquosas

Esta forma de extração vêm sendo empregada nas primeiras etapas dos processos de separação e pré-purificação de biomoléculas. Encontram-se na literatura trabalhos que evidenciam o potencial dos sistemas bifásicos aquosos de auxiliar na identificação dos sistemas mais adequados para as biomoléculas de interesse, tais como: enzimas (PEREZ et al., 2014), aminoácidos (SALABAT et al., 2011), inibidor de β -lactamase como ácido clavulânico (CARNEIRO-da-CUNHA et al., 2014) e antioxidantes (REIS et al., 2012), e alcalóides (PASSOS et al., 2013).

Ênfase maior é dada aos sistemas formados por PEG/sal por apresentarem baixo custo e apresentarem tempo de separação das fases menor que outros sistemas devido à densidade do sistema (BENAVIDES; RITO-PALOMARES, 2008). Nas indústrias química, cosmética e farmacêutica polímero/sistemas de fosfato são os mais comumente utilizados, mas a elevada concentração de sal requerida representa um problema que leva a preocupações de ordem ambiental (MALPIEDI et al., 2009).

Alguns pesquisadores investigaram a utilização do citrato como um substituto para os fosfatos e descobriram que ocorria a formação de duas fases aquosas utilizando PEG/citrato. O citrato é biodegradável e não tóxico, podendo ser despejado em estações de tratamento de água (SELVAKUMAR et al., 2010; PORTO et al., 2011; HERCULANO et al., 2012).

Perez et al. (2015) que para otimizar a extração de tripsina pancreática por S DFA PEG/citrato de sódio e adição de NaCl, alcançaram condições ótimas de extração utilizando PEG3350 e citrato de sódio com adição de NaCl a 3,34% de concentração, que garantiram um fator de purificação de 2,55 e um rendimento de 99,7% na fase superior rica em PEG.

Silva, et al. (2017) na purificação de protease produzida por *Aspergillus tamaris* URM 4634 por S DFA PEG/ citrato obtiveram um fator de purificação de 3,9 utilizando MPEG 8000 e 20% de citrato de sódio. Consequentemente o S DFA revelou-se eficiente, podendo ser aplicado como primeiro passo para pré-purificação de proteases.

Há exemplos na literatura que do uso exclusivo do S DFA para purificação de biomoléculas, entretanto o sistema pode não atingir grau de pureza satisfatório, podendo ser utilizado apenas como uma etapa de pré-purificação, fazendo-se necessário a utilização de outros métodos de purificação.

2.4 Purificação de proteínas por cromatografia

A purificação de proteínas tem como objetivo auxiliar no entendimento das características bioquímicas da enzima pura (tais como pH ideal e temperatura ótima), bem como conhecer sua estrutura, e a partir dessas informações a obter de um produto com maior atividade específica para aplicação em diversos processos (KOBBLITZ; PASTORE., 2004; LI et al., 2014).

As técnicas cromatográficas são métodos físico-químicos de separação e isolamento, que podem ser usadas para identificar e analisar misturas e substâncias isoladamente, (cromatografias analíticas) ou usadas para isolamento e recuperação de compostos (cromatografias preparativas) (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2004). Os compostos presentes em uma mistura são distribuídos entre uma fase estacionária (sólida) e uma fase móvel que se move através dela. Esta técnica é realizada através da distribuição dos compostos entre as duas fases, de tal forma que cada um deles seja seletivamente retido pela fase estacionária. A separação ocorre devido ao fato de os compostos apresentarem diferentes afinidades com a fase estacionária e com a fase móvel; portanto deslocam-se com diferentes velocidades, resultando em migrações diferenciais desses componentes (KRULL, 2012).

As técnicas cromatográficas têm sido amplamente utilizadas com sucesso em desenvolvimento de metodologias de separação e purificação de proteínas. Os primeiros relatos sobre a utilização da cromatografia se deu em 1903, a partir da publicação de um relatório sobre o assunto escrito por Mikhail Semenovich Tswett, que é considerado o marco da invenção da cromatografia (PACHECO et al., 2015).

Existem diferentes princípios para classificar o tipo de cromatografia e qual a mais adequada para aplicação da biomolécula de interesse. Na Figura 3 encontra-se a classificação das técnicas de cromatografia de acordo com o tipo de suporte, modo de separação, natureza da fase móvel, objetivo da separação, composição da fase móvel e modo de preparação (LABVIRTUAL, 2014).

Tabela 2. Classificação das técnicas cromatográficas.

Tipo de suporte	<ul style="list-style-type: none"> Coluna Planar (papel ou placa)
Modo de operação	<ul style="list-style-type: none"> Adsorção Partição Troca iônica Exclusão molecular Afinidade
Natureza da fase móvel	<ul style="list-style-type: none"> Cromatografia gasosa Cromatografia líquida Cromatografia em fluido supercrítico
Objetivo da separação	<ul style="list-style-type: none"> Analítica Preparativa
Composição da fase móvel	<ul style="list-style-type: none"> Isocrática Gradiente
Modo de operação	<ul style="list-style-type: none"> Análise frontal Análise por deslocamento Eluição

Técnicas cromatográficas são amplamente utilizadas para a separação e purificação de proteases; entre elas merecem destaque as cromatografias por exclusão molecular (denominada também gel filtração) e de troca iônica (SHIRASAKI et al., 2013; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2016).

Para o isolamento e a purificação de proteases tem sido utilizado o método de gel filtração, método simples que permite a separação de substâncias com diferenças no tamanho molecular. Sob condições suaves, pode ser utilizado para a purificação de proteínas ou o fracionamento de amostra. É um método não-ligante, ou seja, não ocorre concentração dos componentes da amostra, e de fato, a zona de amostragem é alargada durante a passagem através da coluna, resultando numa diluição da amostra (STRIEGEL et al., 2009).

Adequado para a purificação de proteínas que já passaram por um ou mais passos iniciais de purificação, após estas etapas, o método de gel filtração pode ser usado para remover as impurezas restantes. A proteína alvo purificada obtida após gel filtração pode ser homogênea em tamanho. Esta técnica raramente é utilizada como primeiro passo de purificação, mas pode ser útil para pequenas amostras com complexidade moderada (GE HEALTHCARE, 2012).

A cromatografia por troca-iônica separa proteínas com carga diferente à da superfície para se obter a separação de alta resolução com alta capacidade de carregamento da amostra. A separação baseia-se na interação reversível entre uma proteína carregada e um meio de cromatografia de carga oposta. Proteínas-alvo são concentradas durante a ligação e recolhidas numa forma purificada, concentrada (SARZANNI, 1999).

Esta técnica é amplamente utilizada na purificação de produtos biológicos. Podem ser utilizadas resinas permutadoras de íons fracos, como DEAE (dietilaminoetil) e CM (carboximetil celulose) ou permutadores de íons fortes, tais como amônio quaternário. Muito utilizada para isolamento e separação de proteases esta técnica de purificação de proteínas depende basicamente de quatro passos, como equilíbrio da resina em pH e condutividade, adsorção das proteínas pela resina, eluição destas proteínas e regeneração da resina (DESAY et al., 2000; YADAV et al., 2015).

A eluição da cromatografia pode ser feita de duas formas; a primeira forma utiliza tampão como eluente, sendo a escolha do tampão adequado de suma importância na separação da biomolécula de interesse, uma vez que os íons quando se ligam à proteína podem alterar o comportamento dos mesmos na troca-iônica; na segunda forma é utilizada uma mudança discreta de pH e/ou força iônica (SPADARO, 2006).

Na literatura encontram-se relatos de diferentes técnicas aplicadas na purificação de proteases fúngicas e bacterianas. Yin; Chou e Jiang, (2013) purificaram uma protease ácida produzida por *Aspergillus oryzae* BCRC 30118 por cromatografia de troca-iônica DEAE Sephacel e gel-filtração Sephacryl S-200; ao final do processo a enzima apresentou um fator de purificação de 6,6 e com rendimento de 15,1%.

Ahmed et al. (2011) estudaram a purificação de protease diretamente do extrato bruto obtido por *Aspergillus niger* em meio composto por farelo de trigo, utilizando colunas de troca-iônica, Sephadex G-100 e Sephadex CM e obtiveram uma recuperação de 83,9 e 70,73% e um fator de purificação de 1,58 vezes e 2,41 respectivamente.

Siala e colaboradores (2009) purificaram uma protease ácida extracelular produzida por *Aspergillus niger* II, utilizando cromatografia de gel-filtração Sephadex G-75 como primeiro passo de purificação em coluna; em seguida utilizaram cromatografia por troca-iônica CM-Sephadex C-50 obtendo recuperação de 56% e 3,55% de purificação, respectivamente.

Hajji et al. (2007) utilizaram Sephadex® G-100 como primeira etapa de purificação de uma serina-protease alcalina produzida por *Aspergillus clavatus* ES1 em seguida realizaram cromatografia por troca-iônica CM-Sepharose obtendo um recuperação de 29% e um fator de purificação de 7,5.

Por fim, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas na purificação de proteases; entretanto, é importante destacar que a escolha da estratégia cromatográfica para purificação de enzimas depende, principalmente, da manutenção da atividade proteolítica e do custo envolvido para obtenção do produto final para qual se destinam. Assim, o desenvolvimento de estratégias que possuam o menor número de etapas possível torna-se desafio para indústria biotecnológica.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIAM Associação Brasileira da Indústria e Comércio de Ingredientes e Aditivos para Alimentos, 2015. Disponível:<http://www.abiam.com.br/workshop-abiam/item/18-enzimas-na-fabricac-a-o-de-alimentosco>

ABIDI F, AISSAOUI N, GAUDIN J-C, CHOBERT J-M, HAERTLÉ T, MARZOUKI MNMS Analysis and Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. **Applie Biochemistry Biotechnoly**, v.2, p. 231-247, 2013.

ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F. AND MILANEZ, A.I., Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Braz. J. Microbiol**, v.33,n.4, 2002.

ACOURENE, S., AMMOUCHE A. Optimization of ethanol, citric acid, and α -amylase production from date wastes by strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*, and *Candida guilliermondii*. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnoly**, v.5, p.759-66, 2012.

AHMED, I., ZIA, M.A., IFTIKHAR, T. IKIBAL H., Characterization and detergent compatibility of purified protease produced from *Aspergillus niger* by utilizing agro wastes, **Bioresources**, v.4, n.2. 2011.

ALAGARSAMY, S. LARROCHE, C. PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food grade proteases: a perspective **Food technology and biotechnology**, v.44, n.2, p.211–220, 2006.

ALBERTSSON, P. A. **Partition of cell particles and macromolecules** Wiley-Interscience, New York, 346 p., 1986.

ANITHA T.S., PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression**

Purification v. p.88:214–20.2013.

BABU, B.R., RASTOGI, N.K., RAGHAYARAO, K.S.M.S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polypheno oxidase usin aqueous two-phases system. **Chemical Engeneering and Processing**. v. 47, p.83, 83-89, 2008.

BEYNON, R.J., BOND, J.S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**, 2nd ed. Oxford, Press at Oxford University Press. p.340, 2001.

BENAVIDES,J; RITO-PALOMARES, M. Practical experiences from the development of aqueous two-phase processes for the recovery of high value biological products. **Chemical Tecnolovy and biotechnology** v.83, p.133–142, 2008.

BI, B.;WANG, X.;WU, H.; WEI, Q. Purifcation and characterisation 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.

BIESEBEKE R.T., RUIJTER, G., RAHARDJO, Y.S.P. *Aspergillus oryzae* in solid-state and submerged fermentations Progress report on a multi-disciplinary project. **FEMS Yeast Res** v.2, p.245–248. 2002.

BRADY, D; JORDAAN, J. Advances in enzyme immobilization, **Biotechnol Lett** v.31, p.1639-1650, 2009. doi:10.1007/s10529-009-0076-4

BRANDELLI, A., DAROIT, D.J., RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.1735–1750, 2010.

BRESOLIN, I. R. A. P., BRESOLIN, I.T. L., SILVEIRA, E., TAMBOURGIE. B. AND MAZZOLA, P. G., Isolation and Purification of Bromelain from Waste Peel of Pineapple for Therapeutic **Application Brazilian Archives of Biology and Technology** v.56, n.6: p. 971-979, 2013.

BRIX, K., STÖCKER, W. **Proteases: Structure and Function**, 2013.

CANNEL, E E MOO-YOUNG, M. Solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**, v.15, p. 24-28. 1980.

CARNEIRO-DA-CUNHA, M.N., SOUZA, K.P.S., MOTA, A.M.O., TEIXEIRA, J.A., PORTO, C.S., PORTO, T.S. PORTO, PORTO, A.L.F., Stability of clavulanic acid in PEG/citrate and liquid–liquid extraction in aqueous two-phase system, **Fluid Phase Equilibria** n. 375, p.104-109, 2014.

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

CHARLES P. DEVAMATHAN V, ANBU P, PONNUSWAMY M.N., KALAICHELVAN P.T, HUR B. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **J Basic Microbial** v.48, n.5, p. 374-352, 2008.

CHISTI Y; MOO-YOUNG, M. **Bioreactors Encyclopedia of Physical Science and Technology**, 3 ed. 2, 247-271, 2002.

CHOI, J.M., HAN, S.S., KIM, H.S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects, **Biotechnol. Adv.** v.33, p.1443-1454, 2015.

COURI M., S. ,DAMASO, M.C.T., VERMELHO, A. B., Degradation of feather waste by *Aspergillus niger* keratinases: Comparison of submerged and solid-state fermentation, **International Biodeteration and Biodegradation**, v. 85, p. 189-195, 2013.

DAMARE, S., MURALEEDHARM, U., RAGHUKUMAR, S. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold tolerant proteases **Enzyme and microbial technology**, v.39, n. 26, p. 172-181, 2006.

DEMAIN, A. L., SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **Journal of Antibiotics**, v. 62, p.5–16.2009.

DESAI, M.A., **Methods in Biotechnology, Downstream Processing of Proteins: Methods and Protocol**, edited by: Vol, 9

DUBEY, V.K., PANDE, M., SINGH, B.K., JAGANNADHAM, M.V. Papain-like proteases: applications of their inhibitors. **African Journal Biotechnology**, v. 6, p.1077–1086, 2007.

ESPINOSA-ORTIZ, E. Rene., E.R., Pakshirajan, K. Lens, Piet, N.L. Fungal pellet reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives, **Chemical Engineering Journal**, v.283, p.553-571, 2016.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. D. et al. (Ed.) .Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 229-245, 2004.

FEROZ K. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovative Research in Chemistry**, v.1, 2013.

GAMA SALGADO JA, KANGWA M, FERNANDEZ-LAHOIRE M. Cloning and expression of an active aspartic proteinase from *Mucor circinelloides* in *Pichia pastoris*. **BMC Microbiology**. 13:250, 2013.

GARCIA-GALAN, C., BERENQUER-MURCIA, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R.C. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance **Adv Synth Catal**, v.353, p.2885-2904, 2011.

GERMANO, S., PANDEY , A., OSAKU , C. A. ROCHA, S. N., SOCCOL, C. R., Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation **Enzyme and Microbial Technology** v.32, p.246–251, 2003.

GURPILHARES, D. B., PESSOA, A. ROBERTO, I. C. Process integration for the disruption of

candida guilliermondii cultivated in rice straw hydrolysate and recovery of glucose-6-phosphate dehydrogenase by aqueous two-phase systems. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 176, p.1596–1612, 2015.

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

HAMMAMI, A., HAMDI, M. ABDELHEDI, O. JRIDI O., NASRI, M. BAYOUDH A.
Laboratoire Surfactant- and oxidant-stable alkaline proteases from *Bacillus invictae*:
Characterization and potential applications in chitin extraction and as a detergent additive
International Journal of Biological Macromolecules v.,96, p. 272–281, 2017.

HASHEM, A., SABINA, Y.; MD. KAMRUZZAMAN PRAMANIK, MD. SAIDUL ISLAM,
RAHIM, K.A.; MD. SALIMULLAH and MUSTAFIZUR R. Isolation, Purification and
Characterization of an Extracellular Protease from a Locally Isolated *Bacillus sphaericus* SI-1
Bioresearch communication, v.1, n.2, 2015.

HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; MACIEL, M. H.C; MOREIRA, K. A.; SOUZA-MOTTA,
C. M.; PORTO, A. L.F Partitioning and purification of the cellulolytic complex produced by
Aspergillus japonicus URM5620 using PEG–citrate in an aqueous two-phase system. **Fluid
Phase Equilibria**, v. 335, p.8–13, 2012.

IANNUCCI, N.; CAMPERI, S.; CASCONI, O. Purification of lumbrokinase from *Eisenia
fetida* using aqueous two-phase systems and anion-exchange chromatography. **Separation and
Purification Technology**, v. 64, n. 1, p. 131–134, 2008.

IQBAL M, TAO Y, XIE S, et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and
advances in its applications. **Biological Procedures**, v.18, 2016.

JOSEPHINE, F.S., RAMYA V. S., DEVI, N., GANAPA, S. B., SIDDALINGESHWARA, K.
G., VENUGOPAL, N.; VISHWANATHA T, Isolation, production and characterization of
protease from *Bacillus* sp isolated from soil sample **Journal of Microbiology and**

Biotechnology. v. 2, n.1, p.163-168, 2012.

KIM J.S., SAPKOTA K., PARK S.E., CHOI B.S., KIM S., HIEP N.T., KIM C.S., CHOI H.S., KIM M.K., CHUN H.S., PARK Y., KIM S.J. A Fibrinolytic Enzyme from the Medicinal Mushroom *Cordyceps militaris*. **The Journal of Microbiology**. v.44, n.6, p. 622-631. 2006.

KLOBITZ, M.G.B., PASTORE, G.M. Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus* sp. **Ciência Tecnológica Alimentícia**, v. 24, p. 287-292, 2004.

KOBLITZ, M.G.B. **Bioquímica de Alimentos: Teoria e Aplicações Práticas**.1ª ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008.

KRULL, S I.; **Analytical chemistry**, 2012.

LABVIRTUAL, disponível em:

http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=451%20&id=103&option=com_content&task=view.

LI, C., XU, D., ZHAO, M., SUN L., WANG, Y. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* Europe **Food Research Technology**, v.238, p. 905–917,2014.

LIBRA, J. A., BORCHERT, M., BANIT, S., Competition strategies for the decolorization of a textile-reactive dye with the white-rot fungi *Trametes versicolor* under non-sterile conditions, **Biotechnology and Bioengineering** n.6,v.82, p. 736–744, 2003.

LIMA, U.A et al **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, v.3, 2001.

LLORENTE, B. E., OBREGÓN, W. D., AVILÉS ,F. X., CAFFINI, N. O, VAIRO- CAVALLI, S. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases, **Food Chemistry**, v.159, p.55–63, 2014.

LIMA, L.A, CRUZ FILHO, R.F., SANTOS, J G , Wilson Castro SILVA,W,C Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico **Acta amazonica** 403 v.44, n.4, p. 403 – 410, 2014.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. (2010) **Microbiologia de Brock**. São Paulo.

MALPIEDI, L.P.; ROMANINI, D.; PICÓ, G.A.; NERLI, B.B. Purification of trypsinogen from bovine pancreas by combining aqueous two-phase partitioning and precipitation with charged flexible chain polymers. **Separation Purification Technology**, v. 65, p. 40-45, 2009.

MANDUJANO-GONZÁLEZ VIRGINIA , Alejandro Téllez-Jurado, Miguel Angel Anducho-Reyes,Ainhoa Arana-Cuenca, Yuridia Mercado-Flores Purification and characterization of the extracellular aspartyl protease APSm1 from the phytopathogen fungus *Stenocarpella maydis* **Protein Expression and Purification** v.11, p.1-5, 2016.

MATSUZAWA, T., TAKAKI, G.M.C, YAGUCHI, T, OKADA,K., GONOI, T., HORIE, Y. Two new species of *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from Caatinga soil in the State of Pernambuco, **Brazil mycoscience**, v.55, p.79-88, 2014.

MOHAMMADI, R., MAHMOUDZADE, M., ATEFI, M., KHOSRAV I –DARAN, K. AND MOZAFAR, M.R., Applications of nanoliposomes in cheese technology **International Journal of Dairy Technology**, 68, 2015.

MONTEIRO Elias de Souza. Sistemas aquosos bifásicos: uma alternativa para Purificação de biomoléculas e simulação de sistemas líquidos complexos. **Ciência e Tecnologia**, v.1, p.33-41, 2010.

MONTERRAT, V , BRUINS, M. J., EDENS, L.,KONING, F., Influence of dietary components on *Aspergillus niger* prolyl endoprotease mediated gluten degradation **Food Chemistry**, v.174, p. 440-445, 2015.

MURAT BITEKER,; BASARAN,ÖZCAN; FILIZ BASARAN, NESRIN; SUNGUR BITEKER, F. Low-dose intravenous tissue-type plasminogen activator for prosthetic valve thrombosis is better than standard dose streptokinase Next Document **Rev Port Cardiol**, p.534:569, 2015.

MUSONI, M, Destain, J., Thonart,P.Bahama, JP, Delvigne, F. Bioreactor design and implementation strategies for cultivation of filamentous fungi and the production of fungal metabolites: from traditional methods to engineered systems. **Biotechnologie, Agronomie, Société et environnement** v.19, n. 4, p. 430-442, 2015.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**, First Edition, 2007.

NASCIMENTO, T.P., SALES, A.E., PORTO, C.S., BRANDÃO, R.M.P., CAMPOSTAKAKI, G.M., TEIXEIRA, J.A.C., PORTO, T.S., PORTO, A.L.F., CONVERTI, A Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate). **Journal of Chromatography B**. v. 1025, p. 16–24. 2016.

NEGI,S,; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awari* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, n.4, p.443, 2009.

NEGI, S., BANERJEE R., Optimization of Amylase and Protease Production from *Aspergillus awamori* in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique, **Food Technology and Biotechnology**. v.44, n.2, p. 257–261 257, 2006.

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

NIYONZIMA F.N, MORE SS. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr under submerged fermentation. **Int J Pharm Bio Sci**. v.4, n.1, p.1016–1028. 2013.

NOVELLI, P. K., BARROS, M. M., FLEURI, L. F. 2016 Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization, **Food Chemistry** v.198, p.119–124.

ORLANDELLI, R. C. et al. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. **Revista Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p. 97-109, 2012.

PACHECO, S.*; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M. C. P. A.; NASCIMENTO, L. S. M.; GODOY, R. L. O. História da Cromatografia Líquida **Rev. Virtual Quim.**, v.7, n.4, 1225-1271. 2015.

PADILHA, G.S.; FERREIRA, J.F.; ALEGRE, R.M.; TAMBOURGI, E.B. Efeitos do pH e massa molar do polímero sobre o sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. **Acta Scientiarum Technology**, v.33, n.1, p. 1-4, 2011.

PANDEE, PATCHARAPORN; H-KITTIKUL, ARAN; OHSUGI; MASAHIRO; DISSARA, YAOWALUK Production and properties of a fibrinolytic enzyme by *Schizophyllum commune* BL23. Songklanakarin **J. Sci. Technol** v..30,p. 4, 447-453, 2008

PASSOS, H., TRINDADE, M.P., VAZ, T.S.M., COSTA, L.P., FREIRE, M.G., COUTINHO, J.A.P The impact of self-aggregation on the extraction of biomolecules in ionic-liquid based aqueous two-phase systems. **Sep. Purif. Technol.** v.108, p.174-180, 2013.

PAUL, T,DAS,A,MANDAL,A.,HALDER,S.K.,JANA,A.,MAITY, C., DASMOHAPATRA, P.K., PATI, B.R., MONDAL, K.C., An efficient cloth cleaning properties of a crude keratinase combined with detergent: towards industrial viewpoint , **Journal of Cleaner Production** v,66, p. 672-684, 2014.

PENG, Y., YANG, X., YIZHENG, Z., Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. **Apply Microbiology and Biotechnology**, v.69, p.126-132, 2005.

PÉREZ, R. L., LOUREIRO, D. B., NERLI, B. B., TUBIO, G. Optimization of pancreatic

trypsin extraction in PEG/citrate aqueous two-phase systems **Protein Expression and Purification** , v.106, p.66–71, 2015.

PÉREZ-RODRÍGUEZ, N., OLIVEIRA, F., PÉREZ-BIBBINS B., BELO, I., TORRADO, A. AGRASAR, J. M. Optimization of Xylanase Production by Filamentous Fungi in Solid-State Fermentation and Scale-up to Horizontal Tube Bioreactor **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 173, p.803–825, 2014.

PERICIN, D. M; MADAREV-POPOVIC, S. V. RADULOVIC-POPOVIC, L. M. Optimization of conditions for acid protease partitioning and purification in aqueous two- phase systems using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v.31, p. 43–47, 2009.

PORTO C.S.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, K S.; TEIXEIRA, E. H.; CAVADA, B.S.; IMA-FILHO, J. L.; PORTO, A. L.F., Partition of lectin from *Canavalia grandiflora* Benth in aqueous two-phase systems using factorial design. **Biochemical Engineering Journal** n. 53 p.165–171, 2011.

RANI K, RANA R, DATT S Review on latest overview of proteases. **Int J Curr Life Sci** 2:12–18, 2012.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v.63, p 597-635, 1998.

REIS, I. A. O.; SANTOS, S. B.; SANTOS, L. A.; OLIVEIRA, N.; FREIRE, M.G.; PEREIRA, J. F. B.; VENTURA, S. P. M.; COUTINHO, J. A. P.; SOARES, C. M. F.; LIMA, A. S. Increased significance of food wastes: Selective recovery of added-value compounds. **Food Chemistry**, v. 135, p. 2453-2461, 2012.

ORLANDELLI R C, SPECIAN, V.. FELBER, A. C., R PAMPHILE J; A.Enzimas De Interesse Industrial: Produção Por Fungos E Aplicações **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

RAWLINGS ND, BARRETT AJ, BATEMAN A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, 38, 2010.

RITO- POLOMARES, M. Practical application of aqueous two phases partition to process development for the recovery of biological products, *Journal of Chromatography B*, v.87, 1, p.3-11, 2004.

RODARTE, M. P., DIAS, D. R., VILELA, D. M., SCHWAN R.F. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea Arabica* L.) *Acta Scientiarum. Agronomy Maringá*, v. 33, n. 3, p. 457-464, 2011.

SALABAT, A., SADEGHI, R., MOGHADAM, S. T. & JAMEHBOZORG, B. (2011) Partitioning of L-methionine in aqueous two-phase systems containing poly(propylene glycol) and sodium phosphate salts. *J Chem Thermodyn*, v. 43, p. 1525-1529, 2011.

SÁ-PEREIRA, P. Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. Enzimas em biotecnologia- produção, aplicações e mercado, Rio de Janeiro: Interciência, 11, 433-462, 2008.

SALES, A.E., DE SOUZA, F.A., TEIXEIRA, J.A., PORTO, T.S., PORTO, A.L. Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485 *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.170, p.1676–1688, 2013.

SAMSON, R.A.; VARGA, J. What is a species in *Aspergillus*? *Medical mycology*, v. 47, p. 13-20, 2009.

SARZANINI, C., BRUZZONITI MC, MENTASTI E. Preconcentration and separation of haloacetic acids by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 850, p. 213, 1999.

SAVATHI, S. et al., Fungal protease : production and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal Taiwan Inst Chemical Engineer*, v.42, p.298-304, 2011.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M,C,R, **Biorreatores e Processos Fermentativos.**

Biocetecologia Industrial. Engenharia Bioquímica. 1º ed. São Paulo; Edgard Blucher, v.II cap 8, 2008.

SELVAKUMAR, P.; CLING, T.; WALKERA, S.; LYDDIATT, A. A practical implementation and exploitation of ATPS for intensive processing of biological feedstock: A novel approach for heavily biological feedstock loaded ATPS. **Separation and Purification Technology**, v. 75, p.323–331, 2010.

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.

SHARKOVAA, T. S., KURAKOVA , A. V, OSMOLOVSKIYA, A. A., MATVEEVAA, E KREYERA., O, V. G, BARANOVAA , N. A. EGOROV, N.S. Screening of Producers of Proteinases with Fibrinolytic and Collagenolytic Activities among Micromycetes, **Microbiology**, v.84,n. 3, p. 359–364. 2015.

SHAHINA Z., HOSSAIN M. T. eHAKIM M. A. Characterization of protease producing fungi *Aspergillus funiculosus* and *A. tamaraii*, and their proteases. **Chittagong Univ. J. B. Sci.**,v. 4, n.1 e 2, p.91-98 , 2009.

SHIRASAKA, N;MASAO NAITOU; KAZUKI OKAMURA; MIZUHO KUSUDA • YASUHISA FUKUTA • TAKAO TERASHITA Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3 **Mycoscience** v.53, p.354–364, 2012.

SIALA, R., SELLAMI-KAMOUN, A., HAJJI, M., ABID, I., GHARSALLAH N., AND NASRI, M Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization **African Journal of Biotechnology** v.8, n.18, p.4582-4589, 2009.

SILVA, O., DE OLIVEIRA, R., SOUZA-MOTTA, C., PORTO, A. AND PORTO, T. Novel Protease from *Aspergillus tamaraii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v.4, p.125-143, 2016.

SIM, Y-C., LEE, S-G, LEE D-C, KANG B-Y, PARK K-M, LEE J-Y, Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetics products. **Biotechnology letter**, v.22, n.2, p.137-140, 2000.

SIMKHADA JR, MANDER P, CHO SS, YOO JC. A novel fibrinolytic protease from *Streptomyces* sp. CS684. **Process Biochem.** v.45, p.88-93, 2010.

SOARES DE CASTRO, R. J., NISHIDE, T. G., SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 236–245, 2014.

SOARES RR, AZEVEDO AM, VAN ALSTINE JM, AIRES-BARROS MR. Partitioning in aqueous two-phase systems: Analysis of strengths, weaknesses, opportunities and threats. **Biotechnol J.** v.10, n.8, p.1158-69, 2015.

SOCOL, R.C., PANDEY, A., LARROCHE, C. 2013 **Fermentation processes engineering in the food industry.** CRC Press,.

SOLIS-PEREIRA, S.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLES, G.; GUTIÉRREZ-ROJAS, M.; ROUSSOS, S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; GUNASEKARAN, Production of pectinase by *Aspergillus niger* in solid state fermentations at high initial glucose concentrations. **Journal of Microbiology and Biotechnology.** v.12: p.257-260. 1996.

SPADARO, A.C.C. **Cromatografia por troca iônica.** In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Ed. Unicamp, 2006.

SOUZA, P. M., ALIAKBARIAN, B., FERREIRA FILHO, E. X., MAGALHÃES P. O., PESSOA JUNIOR, A., CONVERTI, A., Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus* **Journal of Biological Macromolecules**, v.81, p. 17–21, 2015.

STRIEGEL ANDRÉ M., WALLACE W. YAU, JOSEPH J. KIRKLAND, DONALD D. Bly

Modern Size-Exclusion Liquid Chromatography: Practice of Gel Permeation and Gel Filtration Chromatography, Second Edition 2.

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

TACCONI, F. S., DEN ABEELE, A.V., BULPA, P., MISSET, B., MEERSSEMAN, W., CARDOSO, T., PAIVA, J., Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions and outcome. **Critical Care**, v.19, p.7, 2015.

VIGNARDET C, GUILLAUME YC, MICHEL L, FRIEDRICH J, MILLET J. Comparison of two hard keratinous substrates submitted to the action of a keratinase using an experimental design. **Int J Pharm.** 14;224 (1-2):115-22, 2001

WAINWRIGHT, M.P.; TRINCI, A.P.J.; MOORE, D. Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process, **Mycological. Resouce.** v.97, p.801-806, 1993.

WUCHERPFENNIG, T.; KIEP, K. A.; DRIOUCH, H.; WITTMANN, C.; KRULL, R. Morphology and rheology in filamentous cultivations. 1st ed. Elsevier Inc., 2010.

YADAV, S. K., BISHT, D., TIWARI, S., DARMWAL, N. S., Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p.667-677, 2015.

YIN, LI-JUNG , CHOU, YA-HUI, JIANG, SHANN-TZONG Purification and characterization of acidic protease from *Aspergillus Oryzae* BCRC 30118. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 21, N. 1, p. 105-110.2013.

ZAFARENLOO, B.; QUANG, T. D.; DAUMOO, S.; et al. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World journal of microbiology e biotechnology**, v. 30, n. 6, p.1755-1762, 2014.

ZHANG, L.; ZHANG, Z.G.; LIU, X.S.; SOLGOT, A.; CHOPP, M. The PI3K/Akt Pathway Mediates the Neuroprotective Effect of Atorvastatin in Extending Thrombolytic Therapy After Embolic Stroke in the Rat. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.27, p. 2470–2475, 2007.

ZIMMER, K.R., BORRÉ, G.L, TRENTIN, D.S., CLOVIS WOICICKOSKI JÚNIOR2. FRASSON, A. P GRAEFF, A.A., GOMES A., MACED, A.J. Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 10, n. 14, p. 123-137,. 2009

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

Produzir e purificar proteases produzidas por fungos filamentosos provenientes da Caatinga.

4.2 Objetivos Específicos:

- Selecionar a linhagem de fungos filamentosos com maior produção de proteases;
- Determinar as melhores condições de produção das proteases em cultivo submerso, utilizando planejamento fatorial;
- Estudar a produção de proteases em biorreator utilizando planejamento fatorial completo (2^2), analisando as variáveis agitação e aeração;
- Caracterizar bioquimicamente as proteases com relação à temperatura e pH ótimos, estabilidade ao pH e da temperatura, inibidores de proteases, influência de íons metálicos, compatibilidade com detergentes e cinética enzimática;
- Extrair e purificar a enzima a partir do sistema de duas fases aquosas e técnicas cromatográficas;
- Analisar a estrutura da proteína por técnicas de espectroscopia: espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular;
- Estudar o efeito da protease sobre o fibrinogênio;
- Avaliar o efeito da albumina sérica na atividade enzimática da protease;
- Analisar o efeito dos solventes orgânico sobre a estabilidade da protease;
- Investigar a capacidade anticoagulante da protease;
- Validar os resultados obtidos.

CAPÍTULO I

Scale up production of protease using *Aspergillus tamarii* UCP 1279 from Caatinga soil

Patyanne Carvalho Correia¹; Ammanda Emmanuele Sales¹; Galba Maria de Campos-Takaki³;
Tatiana Souza Porto,²Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Department of Morphology and Animal Physiology (DMFA), Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil.

²Laboratories Center (CENLAG), Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Academic Unit of Garanhuns, Garanhuns, PE, Brazil.

³Nucleus of Research in Environmental Science and Biotechnology, Catholic University of Pernambuco (UNICAP), Recife - PE, Brazil

*Corresponding author: analuporto@yahoo.com

Grant Sponsor:

FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco)

ABSTRACT

An investigation was carried out on enzyme production of protease secreted by filamentous fungi using submerged fermentation. Thirty-two microorganisms from Caatinga soil were grown on soybean meal to evaluate their proteolytic enzymes. *Aspergillus tamarii* UCP 1279 showed the highest protease activity after 72h of fermentation (66.17 U/mL). By a full-factorial design 2^3 , the optimal combinations of media constituents for maximum protease production (69.77 U/mL) were determined at pH 6.0, glucose concentration (0.5%) and soybean concentration (3%). On subsequent scale-up in a 1.5-L bioreactor, with optimal conditions previously determined by shake-flask fermentation, a full-factorial design 2^2 was applied to evaluate the significance of the protease production. The optimization of protease production in bioreactor was obtained with aeration rate at 0.5 v/v/min and agitation at 450 rpm. Enzyme was stable over a wide pH range (6.0-10.0) and temperature (30- 40°C), with optimal activity at pH 7.0 and 50 °C. The enzyme activity was maintained in the presence of Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{2+} and was inhibited by SDS. Protease inhibition by PMSF confirmed that protease belongs to the serine protease family. Fungal enzyme retained maximum activity up to 74% with all tested commercial detergents after 120 min at room temperature. Scale up production was satisfactory, with potential use for obtaining proteases (particularly serine proteases) with biochemical properties required for industrial applications.

Keywords: bioreactor, scale up production, serine protease, *Aspergillus tamarii*

1 INTRODUCTION

Proteases are a highly important group of enzymes that plays significant functions in all cells. They represent one class of enzymes used to catalyze peptide hydrolysis in aqueous solutions and peptides synthesis in the presence of organic solvents (Gupta 2002; Benmrad et al, 2016) and consequently they are used food processing such as dairy, milk-clotting, baking and yeast hydrolysis and mainly in the detergent industry, where they are incorporated into laundry and dishwashing detergents (Vojcic et al. 2015; Murthy; Naidu 2010). These enzymes account for at least a quarter of all protease sales throughout the world (Li et al., 2014; Vojcic et al., 2015). Industrial demand of proteases with novel and improved properties motivate the research

on regarding the isolation, purification and characterization of new enzymes and the discovery of new promising strains (Niyonzimaa; More, 2014).

Industrially-used proteases are produced by a wide range of microorganisms including bacteria, filamentous fungi and yeasts. Filamentous fungi, in special, are used in many industrial processes with a number of the advantages such as low material costs, high productivity, faster growth rate, production, easily recover and activity in a wide range of pH (Shankar et al.,2011). Fungi are normally recognized as GRAS (generally regarded as safe), which presents advantages when compared with other sources of enzymes (Zafanreloo et al.2014), and many fungal species, particularly from the genus *Aspergillus*, have been proved to be high producers of extracellular stable proteases (Souza et al., 2015; Espinosa-Ortiz et al., 2016).

The Caatinga is an ecosystem unique to Brazil that is home to many endemic species of plants, animals, and microorganisms. This soil is poor in mineral and organic nutrients, and low water activity (ALI et al., 2011), due to its environmental characteristics, presents organisms resistant to extreme conditions (SENA et al., 2006). Consequently, in situations of stress, many organisms respond with increased production of enzymes with high biotechnological potential. *Aspergillus* species are able to produce a variety of enzymes, and the proteases of global concern for biotechnological and pharmaceutical purposes (VERMELHO et al., 2013).

During fermentative processes, microorganisms are influenced by the media composition and conditions of culture; therefore, all variables need to be carefully monitored, such as: physical (time, temperature, water activity, pressure, stirring speed and flow of gases and liquids), chemical (pH, acidity, soluble solids and dissolved oxygen) and biological (measurement of microbial growth and extent of contamination) factors (Abidi et al., 2011).

Fermentations are performed on different scales of production, from bench, pilot and finally at industrial scale with variable volumes from 1.5 to 100 liters, reaching even 100,000 liters during large scale operationle). Submerged fermentation has been successfully used to study the production of fungal enzymes both in shake flasks or in bioreactor (Negi; Banerejee, 2006; Souza et al, 2015).

Considering the application of proteases on the detergent industry and the importance to search stable enzymes for such purposes, this study aims to find the best conditions for obtaining proteases from *Aspergillus tamaritii* UCP 1279, through submerged fermentation in different scales, as well as to biochemically characterize the enzyme and its detergent compatibility.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism

Thirty-two filamentous fungi strains were tested for protease production. The Culture Bank of Microorganisms from the Catholic University of Pernambuco (UCP) provided fungal species that were isolated from Caatinga soil (Northeast region of Brazil) and were grown in Czapek agar medium for 7 days, to be further used as inocula for submerged fermentations.

2.2 Screening for protease production by submerged fermentation

For protease production by submerged fermentation, the soybean medium (MS-2) described by Porto et al. (1996) was used. The medium was composed of soybean filtrate (2%), K₂HPO₄ (0.435%), and 1 mL of mineral solution in distilled water containing for 100 mL: FeSO₄·7H₂O (100 mg), MnCl₂·4H₂O (100 mg), ZnSO₄·H₂O (100 mg), NH₄Cl (0.1%), MgSO₄·7H₂O (0.06%) and glucose (1%). Fermentation medium was sterilized in autoclave at 121°C for 20 min in Erlenmeyer flasks containing 50 mL of culture medium inoculated with a fungal spore suspension to give a final concentration of 10⁴ spores/mL. Flasks were incubated under agitation at 120 rpm and 30°C for 72h.

2.3 Production of protease using factorial design in shaker flask

Experiments were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing soybean medium MS-2 (Porto et al. 1996) autoclaved for 20 min at 121°C. A full-factorial design (2³) was used to determine the influence of the parameters: soybean concentration, glucose and pH on the response protease activity (Table 1). After inoculation (10⁴ spores/mL), the flasks were incubated for 24, 48 and 72h of fermentation. All results were performed using the software Statistica 8.0 (Stasoft, 2008).

Table 1. Levels of the independent variables studied according a 23 full factorial design for protease production by *Aspergillus tamarii* UCP 1279.

Variable	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
Soybean flour (%)	1.0	2.0	3.0
Glucose (%)	0.5	1.0	1.5
pH	6.0	7.0	8.0

2.4 Production of protease on Stirred-tank Bioreactor

Pre-inoculum was prepared in 50 mL Erlenmeyer flasks each containing 2% of the working volume of the soybean medium with 10^4 spores/mL. After incubated at 30°C and 120 rpm for 24h, it was transferred to a bioreactor containing 0.800 mL of the MS-2 medium described by Porto et al. (1996). Fermentations were carried at 30°C and initial pH 6.0 out for 72 h under agitation and aeration conditions determined by a full factorial design 2^2 (Table 2).

Table 2. Levels of the independent variables studied according to a 22 complete factorial design for protease production in bioreactor.

Variable	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
Aeration (vvm)	0.5	1.0	1.5
Agitation (rpm)	150	300	450

2.5 Protease activity assay

Protease activity was performed at 25°C as described by Ginther (1979). The reaction was carried out with 0.250 mL of 1.0% Azocasein (Sigma, ST. Louis, Mo) diluted in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.2, containing 1.0 mM of CaCl₂. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme enough to promote a 0.01 increase in absorbance at 420 nm. Analyses were made in triplicate.

2.6 Protein content determination

Protein content was determined by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin as a standard. Each analysis was performed in triplicate.

2.7 Glucose concentration

The release of reducing sugars was determined by the glucose oxidase kit by DNSA (Labtest Diagnostica S.A, Brazil) using a standard curve at glucose concentration in the range 0-4 mg/mL.

2.8 Determination of biomass concentration

The growth curve of the microorganism was determined by measuring the dry biomass, according to Olsson and Nielsen, (1997).

2.9 Effect of pH on protease activity and stability

The optimum pH for protease activity was determined by incubation in buffer in the pH range 5.0-11.0. The buffers used were 0.1 M citrate-phosphate (pH 5–7), 0.1 M Tris-HCl (pH 7-8) and 0.1 M glycine–NaOH (pH 9–11). The assays were performed at 25°C, and the maximum activity was expressed as 100%. The pH stability of the crude extract was carried out by incubating the enzyme for 24 h in same buffers as above the buffer in the pH range 5–11 at 25°C, followed by the activity assay. Maximum activity obtained within the range was expressed as 100%, used as reference to calculate the residual activity.

2.10 Effect of temperature on protease activity and stability

The effect of temperature on the enzyme activity was determined by incubating the crude extract at temperatures ranging from 20°C to 70°C for 60 min. Enzyme activity was determined as described in the section 2.3. To determine the temperature stability, aliquots of the extract were collected every 30 min during a total period of 180 min, with subsequent determination of their activity.

2.11 Effect of metal ions on the protease activity

The crude extract activity was tested in the presence of metal ions. Described as inhibitors or activators of protease activity. The substrate azocasein 1% was prepared in

presence of with different metal ions (in the concentration of 5 and 10 mM): calcium (CaCl₂), potassium (KCl), zinc (ZnSO₄) and copper (CuSO₄), in 0.1 M Tris-HCl buffer pH 7.6, and then assayed as described in the section 2.3.

2.12 Effect of inhibitors on protease activity

To evaluate the effects of inhibitors on the enzyme activity, the crude extract was exposed to: phenylmethylsulfonyl fluoride (5 mM), 2-mercaptoethanol (5 mM), ethylenediaminetetraacetic acid (5 mM), pepstatin A (1 mM) and iodoacetic acid (5 mM); for 60 min at 37 °C. The enzyme activity without inhibitor was considered as control (100%).

2.13 Effect of surfactants on the enzyme stability and compatibility with commercial detergents

The effect of surfactants (1%) on enzyme activity was determined by pre-incubating the crude extract with different non-ionic surfactants (sodium dodecyl sulfate - SDS, Tween 20, Tween 80, and Triton X-100) at 40°C for 120 min. Aliquots were collected after 75 and 120 min of assay time. The enzyme activity was determined as described in the section 2.3. Residual activity was calculated in relation to the control (sample with maximum activity) (Moreira, 2002). The stability of protease in various solid (7 mg/ml) and liquid (1%, v/v) detergents was evaluated by incubating crude enzyme extracts for 1 h at 25°C and 40°C. The residual enzyme activity was determined under standard assay conditions. The activity of crude extracts of a control sample (without detergent), incubated under similar conditions, was considered as 100%. The solid detergents tested were: Ala (Protec & Gamble, Cincinnati, Ohio, USA); Bem-te-vi (ASA, Recife, Pernambuco, Brazil), Omo Multi-Ação (UniLever, London, UK). The liquid detergent tested was Ariel (Procter and Gamble).

2.14 Kinetics parameters of protease activity

Kinetic assays were performed under optimal temperature and pH conditions with azocasein ($2 \leq S_0 \leq 100$ mg/mL) as the substrate. K_m and V_{max} were calculated according to Lineweaver-Burk double-reciprocal graph ($1/V$) versus ($1/[S]$) (Lineweaver and Burk, 1934).

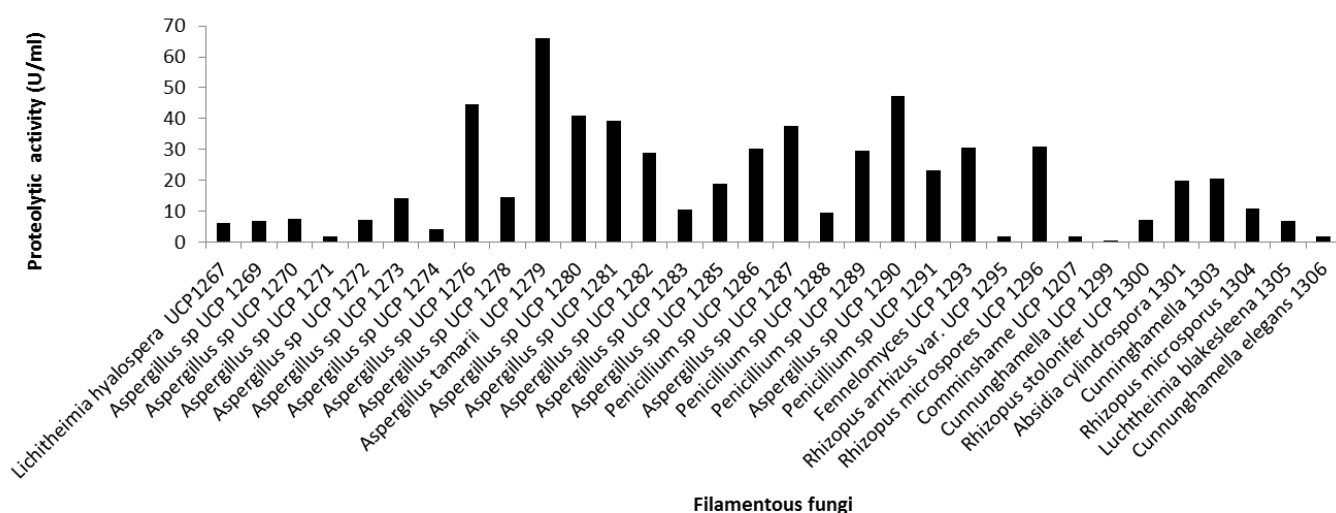
3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Screening for protease production

Thirty-two filamentous fungi strains from Caatinga soil were evaluated for their potential to produce proteases using soybean medium and all they were successfully applied for obtaining the enzyme. The genus *Aspergillus* showed the highest production of protease after 72h of fermentation compared to other strains. According to the results showed in Figure 1, it was observed that the highest protease activity (66.17 U/mL) was obtained with the strain *Aspergillus tamaris* UCP 1279. Based on the results of screening, only this strain was further used to study the microbial kinetics and enzyme characterization.

Souza et al. (2015) reported production of different proteases by several filamentous fungi using agro-industrial residues, in special fungal strains from *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola* and *Thermoascus*. Among these genera, *Aspergillus* is the most used for large-scale production, since most of its species can grow and produce enzymes on relatively inexpensive media (Bergquist et al., 2002, Niyonzima; More, 2013).

Fig 1. Screening for proteolytic activity of protease produced by filamentous fungi in soybean medium after 72h of submerged fermentation.



Most of the species used for large-scale production used for large-scale production can grow and produce enzymes on relatively inexpensive media (Bergquist et al., 2002, Niyonzima; More, 2013).

A comparative study by Novelli et al. (2016) showed protease production by several *Aspergillus* and *Penicillium* species. Using soybean medium as substrate, these authors observed activities of 10.13 U/mL and 21.99 U/mL for proteases produced by *A. brasiliensis* and *A. flavipus*, respectively, whilst only a low activity level was detected for *A. niger* 40018 and no activity for *A.niger* 40065, 40001 and 40015. When wheat bran was used as substrate, *A. brasiliensis* and *A. flavipes* were the best producers (with activities of 11.89 U/mL and 27.78 U/mL, respectively), followed by *A. oryzae* (5.10 U/mL). These results point out the relevance of protease activity found for *Aspergillus tamarii* UCP 1279 (66.17 U/mL) in the present study.

Experiments were carried out to study the effects of soybean, glucose concentration and pH on protease production according the 2³ factorial design. Table 3 shows the values obtained after 72h of fermentation.

Table 3. Protease production by *Aspergillus tamarii* UCP 1279 in shaker flasks using the 2³ factorial design outlined in Table 1.

Run	Glucose	Soybean	pH	Protease activity after 72h (U/mL)
1	0.5	1.0	6.0	40.1
2	1.5	1.0	6.0	21.3
3	0.5	3.0	6.0	69.7
4	1.5	3.0	6.0	26.9
5	0.5	1.0	8.0	37.3
6	1.5	1.0	8.0	21.7
7	0.5	3.0	8.0	56.7
8	1.5	3.0	8.0	28.0
9 (C)	1.0	2.0	7.0	26.9
10 (C)	1.0	2.0	7.0	39.2
11 (C)	1.0	2.0	7.0	32.7
12 (C)	1.0	2.0	7.0	25.8

The maximum production of protease was obtained in the runs 3 (69.77 U/mL) and 7 (56.77 U/mL), performed in media composed of 0.5% glucose and 3% soybean and pH 6 and 8, respectively. The fact that the highest values for protease activities were found in concentrated

nitrogen source medium, indicates that soybean could induce the enzyme synthesis by the microorganism.

A. tamaritii UCP 1279 was able to grow and produce protease in a pH range of 6.0–8.0, with maximum production at pH 6.0 (69.77 U/mg). Similar results were obtained by Boer and Peralta (2000) and Shahani et al (2009) when studied fermentations by *A. tamaritii* at pH 6.0. Siddaligeswara et al. (2014) found that an initial pH 6.0 was suitable for protease production by *A. oryzae* KS5 in submerged fermentation.

Enzyme production in submerged fermentation can be influenced by its substrate composition, for example the presence of given carbon and nitrogen sources may induce or repress the synthesis of some biomolecules (Castro, Sato, 2013; Souza et al, 2015). There are numerous studies using different culture media based on consisting of glucose as a source of carbon supplemented with peptone of meat and casein as sources of nitrogen, meanwhile alternative sources of carbon (sucrose, fructose) and nitrogen (peptone, ammonium sulfate) as well as industrial waste are searched (Bouacem et al., 2015; Cheng et al., 2010; Salihi et al., 2017)

The statistical analysis using ANOVA (analysis of variance) showed that after 72h of fermentation glucose and soybean concentration were significant at a confidence level of 95% ($p < 0.05$). In particular positive and negative effects of soybean and glucose concentrations, (Table 4) were noticed, respectively, mean that the enzyme production can be induced by an increase in the soybean concentration and a decrease in the level variable of glucose.

Table 4. Statistical analysis of the effect of variables and their interactions on protease activity by *Aspergillus tamaritii* UCP 1279.

Variables	Fermentation time 72h
(1)Glucose concentration	-6.09*
(2)Soybean concentration	3.50*
(3)pH	-0.82
1*2	-2.14
1*3	0.98
2*3	-0.55
1*2*3	0.63

*significant effect $p < 0.05$

Gupta et al. (2002) showed that the carbon to nitrogen ratio in the culture medium regulates the production of proteases, and its increase may stimulate the production of protease, as found in the present work.

Niyonzima and Moire (2013) studying the protease production by *A. terreus* in comparison with different media containing different types of nitrogen sources verified that the fungus was able to use all them with high production level in the presence of soybean meal. The protease production was doubled by addition of 0.5% soybean meal to the cultivation medium (from 10.69 U/mL to 21.55 U/mL).

The production of extracellular protease by *A. tamarii* was studied by Boer and Peralta (2000), who tested different substrates in the media composition. High levels of protease were found when a mixture of glucose plus casein (63.4 U/mL) or gelatin (110.5 U/mL) was used, however, an evident decrease in protease production of protease was observed with the addition of glucose.

These results show that nitrogen and carbon source have both significant influence on the production of protease, in that high concentration of glucose caused repression of protease production, thus corroborating our results.

3.2 Production of protease on stirred-tank bioreactor using factorial design

The inoculum is considered an important biological factor for obtaining biomolecules through fermentative processes, since it is a direct variable to determine the biomass production level in fermentations. Different inoculum amounts were necessary to be tested before the beginning of the factorial design, since high inoculums concentration promoted cell aggregation on the bioreactor agitation system 36h of fermentation, hence affecting the homogenization of the culture medium. Therefore, all the studies in bioreactor were performed using 2% of inoculum with 10^4 spores/mL, a low concentration when compared to other studies in the literature using species of the genus *Aspergillus* (Kelly et al., 2004; Negi and Banergi; 2009; Bakri et al., 2011).

A relevant result obtained in the present study was the high production of protease by *A. tamarii* UCP1279 into shake flask at 0.5% glucose, pH 6.0, and 3% soybean medium after 72h of fermentation. Runs were performed according to a 2^2 factorial design (Table 5), on this optimum culture medium evaluating three different airflow rates (0.5, 1.0 and 1.5 vvm) and three agitation rates (150, 300 and 450 rpm).

Table 5. Production of proteases by *Aspergillus tamarii* UCP 1279 in bioreactor according to a 22 factorial design.

Runs	Aeration (vvm)	Agitation (rpm)	Protease activity after
			72h (U/ml)
1	0.5	150	11.9±0.2
2	0.5	450	57.1±1.5
3	1.5	150	20.2±0.3
4	1.5	450	61.2±0.9
5(C)	1	300	33.8±0.5
6(C)	1	300	31.4±0.5
7(C)	1	300	29.7±0.4

Maximum protease activities achieved by combination of different variables were observed in the run 2 57.15 U/mL carried out at 0.5 vvm and 450 rpm equivalent to, and in the run 4 61.27 U/mL carried out at 1.5 vvm and 450 rpm. The statistical analysis showed a significant enzyme production only under the effect of agitation (Table 6), which suggests production levels proportional to the agitation rate.

Table 6. Statistical analysis of the effects variables and their interactions on protease activity by *Aspergillus tamarii* UCP1279 in bioreactor.

Variables	Fermentation time
	72h
(1)Agitation	6.07*
(2) Aeration	-2.31
1*2	-1.54

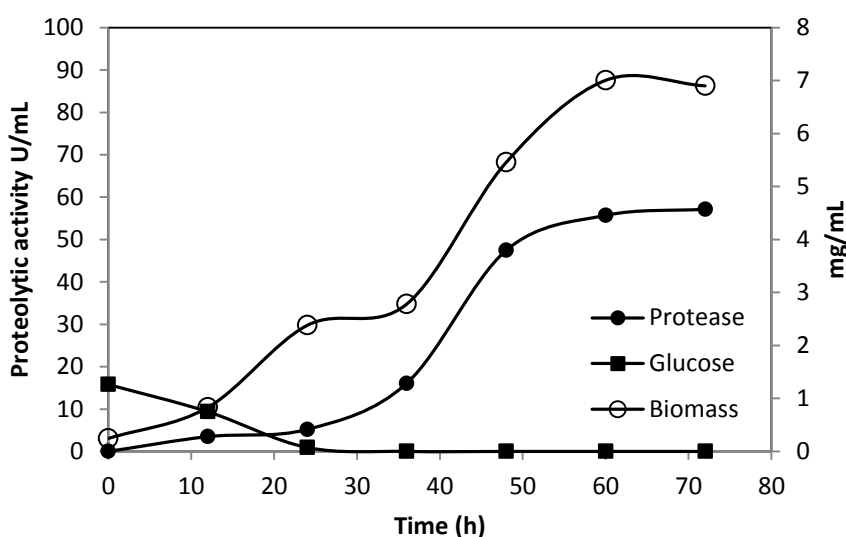
Fungal morphology, pellet size, cell structure and survival are affected by the agitation in a stirred-tank bioreactor, and generally higher agitation rates yield smaller and more compact pellets (Espinosa-Ortiz et al., 2016). Our results indicate that higher agitation rates promoted an increase of the shear stress, favoring the production of the enzyme. An additional beneficial effect of agitation is to diminish the size of mycelial aggregates, making oxygen more easily accessible to cells (Jafari et al., 2007).

Figure 3 shows the curves of biomass growth, glucose concentration and protease production by *Aspergillus tamarii* UCP 1279 in fermentations carried out in bioreactor. The

carbon source influenced the protease production, since an increase in the enzyme activity was concomitantly observed with the glucose depletion in the medium. The growth curve and protease activity showed a similar profile from 36h until 72h of fermentation.

Aspergillus species degrade polysaccharides to obtain monomeric sugars used as carbon source for the growth and enzyme production (Gupta et al., 2002; Krosravi et al, 2015). The fact that the protease activity increases inversely to the substrate concentration can be explained by a repression of product formation by sugar concentration.

Fig 2. Curves of biomass, glucose consumption, and protease production by *Aspergillus tamaris* UCP 1279 cultivated in bioreactor at 0.5% glucose, pH 6.0, and 3% soybean concentration.



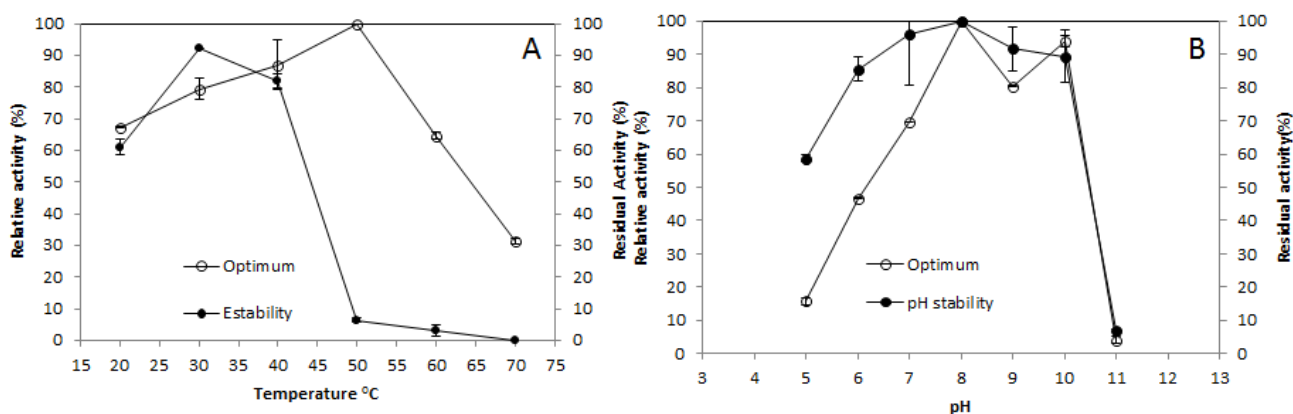
3.3 Effect of pH and temperature on enzyme activity and stability

The pH of the medium on the protein structure by ionizing aminoacids and consequently altering its primary and secondary conformations. The protease from *A. tamari* UCP1279 was active in the pH range 7.0-10.0, with an optimum pH of 7.0 (Fig 4), the enzyme was highly stable in the pH range 7.0-10.0 after 24 h of incubation, retaining 80% of its activity, which suggest that the enzyme was optimally active under alkaline condition. At pH 5.0 the protease retained 56% of its activity and lost it completely at pH 11.0. It is possible that very alkaline conditions could have modified the structure of enzyme active sites and/or substrate and consequently affect their interaction (Horikoshi, 1990; Yadav et al., 2015).

A protease from *A. niger* described by Dubey et al (2010) also presented optimal activity at pH 8.0. The pH range of 7.5-10.0 was reported as beneficial for many proteases from filamentous fungi: among *Myceliophthora* (Zanphorlin, 2011), *A. oryzae* (Karthic et al, 2014) and *Aspergillus nidulans* (Charles et al., 2008).

The effect of temperature on protease stability was studied. The enzyme activity was maintained in most of the tested temperatures, with optimal activity at 50°C. The protease retained more than 80% of its activity at 30°C and its decrease was observed above 50°C. Niyonzima and More (2015), using a protease from *Aspergillus terreus* observed similarly maintaining of the enzyme activity at low and high temperatures, with maximum activity at 50 °C.

Fig 3. Effect of temperature (A) and pH (B) on the activity and stability of protease from *Aspergillus tamarii* UCP1279.



3.4 Effect of Metal Ions and inhibitors on Protease Activity

Effects of metal ions on protease activity of *Aspergillus tamari* UCP 1279 are summarized in Table 7. Most of the metal ions did not show any alteration in enzyme or at least only slightly decreased the enzyme activity. Oppostely, inhibitory effects were observed with Cu^{2+} at concentration of 5 mM (66.7%) and 10 mM (65.3%). Inhibitory effects of Cu^{2+} on proteases of *Aspergillus niger* have been also reported by Siala et al (2009) and Yadav et al (2015).

Nascimento et al. (2015) studying a protease produced by *Mucor subtilissimus* UCP 1262 observed a decreased activity in the presence of Cu^{2+} ions at the same concentrations of 5 mM and 10 mM. Since the catalytic triad of alkaline proteases consists of Asp–Ser–His, the

binding of Cu²⁺ to His prevents the imidazole group to participate as a general base in the catalysis (Heba et al., 2012).

Table 7. Effect of metal ions on the residual activity of protease from *Aspergillus tamarii* UCP 1279.

Metal ion	Residual Activity %	
	5mM	10Mm
Control	100.0	100.0
CaCl ₂	98.7 ± 0.8	75.3 ± 2.0
KCl	82.8 ± 2.8	82.6 ± 0.5
ZnSO ₄	44.1 ± 0.9	46.3 ± 1.5
MgSO ₄	94.3 ± 1.3	78.1 ± 0.7
CuSO ₄	33.3 ± 0.2	34.7 ± 0.8
FeSO ₄	48.9 ± 2.1	48.6 ± 2.1

3.5 Effect of Inhibitors on ProteaseActivity

Regarding the effect of inhibitors on the enzyme, no significant alterations on the protease activity were found in the presence of EDTA, Iodoacetic acid, Pepstatin A and β-mercaptoethanol. On the other hand, the enzyme inhibitor PMSF was significantly effective, inhibiting the protease activity 75% (Table 8). Savitha et al. (2011) and Shirasaka et al. (2012) studying fungal protease observed an enzyme inhibition by PMSF and unchanged activity in the presence of EDTA, indicating that it belongs to the serine protease family.

Table 8 Effect of inhibitors on the residual activity of protease from *Aspergillus tamari* UCP 1279.

Inhibitors	Concentration (mM)	Residual activity (%)
Control	-	100
EDTA	5	63.9 ± 0.4
β-mercaptoethanol	5	77.1 ± 0.8
Pepstatin	1	92.6 ± 1.0
Iodoacetic acid	5	103.1 ± 0.9
PMSF	5	25.2± 0.0

3.6 Effect of surfactant

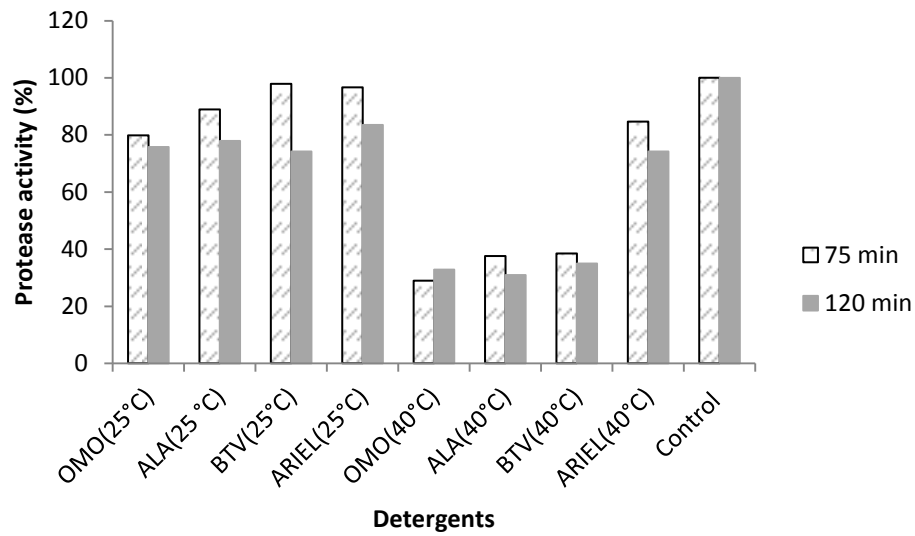
Table 9 show the effect of different surfactants on the relative activity of the protease. The enzyme retained almost 100% of its activity in the presence of 1% of Tween 80, Tween 20 and Triton X-100 and was completely inhibited in the presence of SDS after 75 min. Inhibitory effect of surfactants was also reported by Papagianni and Sergelides (2014) when studied a protease from *Penicillium nalgiovense* and by Biaggio et al. (2015) studying a protease from *Aspergillus terreus*. Inhibition by SDS may be the consequence of combined effects of factors such as reduction in the hydrophobic interaction, which plays a crucial role in maintaining the tertiary structure of the protein and other interactions in the polypeptide chain (SAMPAIO; SILVA et al., 2011).

Table 9 Effect of surfactants on relative activity of protease from *Aspergillus tamaris* UCP 1279 in different time (min).

Surfactants (%)	Relative activity (%) / after diferente times (min)		
	30	75	120
Control	100	100	100
SDS	7.1 ± 2.0	0 ± 0.0	0.0
Triton X-100 1%	99.7 ± 0.4	105.1 ± 17.7	100.6 ± 0.0
Tween 80 1%	110.2 ± 0.0	110.8 ± 4.8	118.8 ± 0.6
Tween 20 1%	114.8 ± 0.8	108.8 ± 3.6	116.6 ± 0.3

To evaluate the commercial potential of the protease in the detergent industry, its stability and compatibility were tested using commercial powder and liquid detergents at 25°C and 40°C. Protease from *Aspergillus tamaris* UCP 1279 showed 100% of stability in the presence of the commercial powder detergent Bem-te-vi® and liquid detergent Ariel® at 25°C after 75 minutes. At 40°C and after 75 min, in the presence of the powder detergents Omo Multi-ação®, ALA and Bem-te-vi, the enzyme retained about 32.93, 30.54 and 35.43 % of its residual activity, respectively. Yadav et al., (2015) reported an alkaline serine protease of *Aspergillus flavus* MTCC 9952 with 52% and 68% of residual activity in the presence of the detergents Surf excel® and Ariel®, respectively. Studies have reported that protease activity was decreased in the presence of some commercially available detergents at 40°C, with residual activity of 16% for Revel, 11.4% for Ariel and 6.6% for Wheel (Bhoshale, 2003). Kalpana Devi et al. (2010) reported that Ariel detergent retained 23% of protease activity after 60 minute.

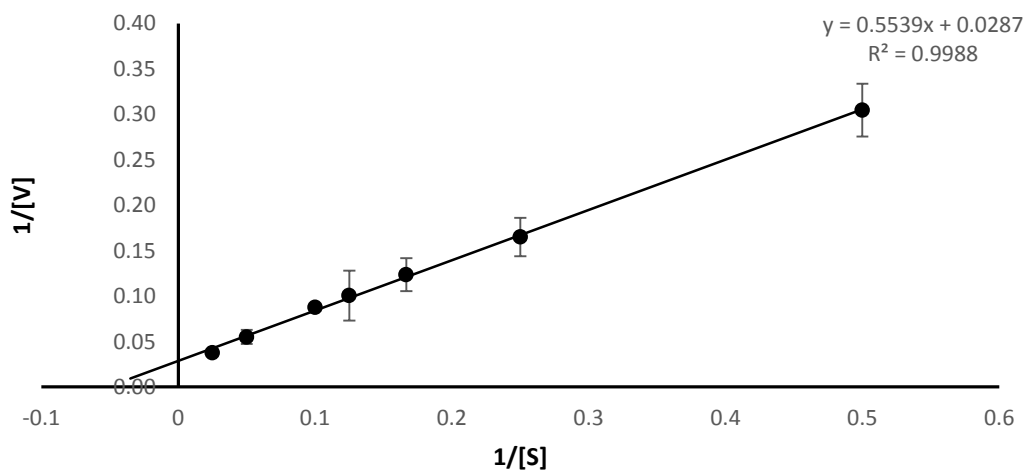
Fig 4 Stability of the proteases of *Aspergillus tamarii* UCP 1279 in the presence of various commercial detergents.



3.7 Kinetics parameters of the protease activity

The K_m and V_{max} values were determined by Lineweaver-Burk plots (Figure 6). The protease produced by *Aspergillus tamarii* UCP 1279 showed K_m and V_{max} values of 19.3 mg/mL and 34.8 mg/mL/min, respectively. Mustaq et al. (2013) reported V_{max} of 54.30 mg/mL/min for a protease from *Rhizopus oryzae* and Omolare et al. (2015) reported a K_m of 40.13 mg/mL for a protease from *Aspergillus niger*.

Fig 5 Lineweaver-Burk plot of protease from *Aspergillus tamarii* UCP 1279.



4 CONCLUSION

It can be assumed that combination of aeration and agitation conditions, culture technique and bioreactor design should be taken into account in the scale-up production of protease from *Aspergillus tamaris* UCP1279. The methods here described were successful to obtaining a thermostable alkaline serine protease with a good compatibility to anionic surfactants and local commercial detergents. These properties are indicative of its potential use in the detergent industry and, in general, in biotechnological applications.

5 ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco) for funding this present study. CNPQ and SISBIOTA/ RENNORFUN.

6 REFERENCES

Abidi F, Chobert J-M, Haertlé T et al. 2011 Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochem* 46:2301–2310.

Benmrada, M. O. , Elhoula, M. B., Jaouadia, N. Z. , Mechria, S. , Rekika, H. , Kourdalib S. , El Hattab, M., Badisb, A., Bejara, S. , Jaouadia B. 2016 A novel organic solvent- and detergent-stable serine alkaline protease from *Trametescingulata* strain CTM10101, *International Journal of Biological Macromolecules*, 92, 299-315.

Bergquist, P.L., Te'ó, V.S. JR., Gibbs, M.D., Cziferzky, A.C.E., De Faria, F.P., Azevedo, M.O., Nevalainen, K.M.H. 2002 Production of recombinant bleaching enzymes from thermophilic microorganisms in fungal hosts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100; 165-176.

Biaggio, R. T, Rodrigues da Silva, R., Gonsales da Rosa, N., R Leite, S. R., Arantes, E.C Cabral, T. P. F. Maria A., Juliano L., Cabral H. 2015 Purification and biochemical characterization of an extracellular serine peptidase from *Aspergillus terreus*, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46, 298-304.

Boer C G and Peralta, R M 2000 Production of extracellular protease by *Aspergillus tamari* J. Basic Microbiol. **40** 2, 75–81.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. Analytical Biochemistry, 72, 248- 252.

Castro R.J.S., Sato, H.H. 2013 Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. Industrial Crops and Products, 49, 813-821.

Charles P. Devamathan V, Anbu P, Ponnuswamy M.N., Kalaichelvan P.T, Hur B. 2008 Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. J Basic Microbil 48 (5) 374-352.

Dubey R., Adhikary, S., Kumar, J. and Sinha N. 2010. Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents, Developmental Microbiology and Molecular Biology v.1, n.1, pp.75-94.

Espinosa-Ortiz, E. Rene., E.R., Pakshirajan, K. Lens, Piet, N.L. 2016. Fungal pellet reactors in wastewater treatment: Applications and perspectives. The Chemical Engineer Journal, 283, 553-571.

Ginther, C.L. 1979. Sporulation on the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamduran*. Antimicrob. Agents Chemother.,15:522-526.

Gupta, R., Beg, Q. K., Larenz, P. 2002 Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Applied Microbiology and Biotechnology, 59, 15–32.

Heba, I., Abo-Elmagd, A. and Housseiny, M.M. (2012) Purification and characterization of carboxymethylcellulase and protease by *Ulocladium botrytis* preuss ATCC 18042 using water hyacinth as a substrate under solid-state fermentation. Annals of Microbiology, 62, 1547-1556.

Horikoshi, K. 1990. Enzymes of alkalophiles. In: Fogarty, W.M., Kelly, C.T. (Eds.), *Microbial Enzymes and Biotechnology*, second ed., Elsevier Applied Science, London, p. 275-294.

Karthic, J. Y.Saroj, M., Naveen, T., Pramod, K.G., Siddalingeshwara 2014 Characterization of *Aspergillus oryzae* protease through submerged fermentation Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci 3(5):1023-1028.

Khosravi, C., Benocci, T., Battaglia, E., Benoit, I., P. de Vries, R. 2015. Chapter One – Sugar Catabolism in *Aspergillus* and Other Fungi Related to the Utilization of Plant Biomass, *Advances in Applied Microbiology*, v.90, p. 1-28.

Jafari, A. R.; Sarrafzadeh, M. H.; Alemzadeh, I. Vosoughi, M. (2007), Effect of stirrer speed and aeration rate on the production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. J. Biol. Sci., 7, 270-275.

Li Caihong, X.D., Zhao, M., Sun, L., Wang, Y. 2014. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fusant by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. Eur. Food Res. Technol. 238, 905–917.

Lineweaver H, Burk D (1934) The determination of enzyme dissociation constants. J. Am Chem Soc 56:568-666.

Murthy, P.S., Naidu, M.M., 2010. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation utilizing coffee by-products. Appl. Sci. 8, 199–205.

Mushtaq Z., Irfan M., Nadeem M., Naz M, Syed Q. 2015 Kinetics study of extracellular detergent stable alkaline protease from *Rhizopus oryzae* Food and Biotechnology Research Center 58,2, 175-184.

Mushtaq, Z., Irfan, M.; Nadeem, M., Naz, M., Syed, Q. 2015 Kinetics Study of Extracellular Detergent Stable Alkaline Protease from *Rhizopus oryzae* Braz. Arch. Biol. Technol. 58 2: 175-184.

Nascimento, T.P.; Sales, A.E.; Porto, C.S.; Brandão, R.M.P.; Takaki, G.M.C.; Teixeira, J.A.C.; Porto, T.S.; Porto, A.L.F. 2015 Production and characterization of new fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 in solid-state fermentation. *Adv Enzyme Res.*, v.3,p.81-91.

Negi, S., Banerjee R., 2006 Optimization of Amylase and Protease Production from *Aspergillusawamori*in Single Bioreactor Through EVOP Factorial Design Technique, *Food Technology and Biotechnology*. v.44, n.2, p. 257–261 257.

Negi,S.; Banerjee, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awari* in a single bioreactor. *Food Research International*, v. 42, n.4, p.443, 2009.

Niyonzima F. N., More, S. S 2015. Purification and characterization of detergent- compatible protease from *Aspergillusterreus*gr. 3 *Biotech*. 5(1): 61–70.

Niyonzima F.N., More, S.S. 2013 Screening and optmitazion of cultural parameters for an alkaline protease production fermentation.*Int J Pham Bio Sci*. 4: 1016-1028.

Niyonzima, F.N., More, S.S. 2014. Detergent-compatible bacterial amylases *Appl Biochem Biotechnol* 174:1215–123.

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.

Olsson, L. and Nielsen, J., 1997. On Line and in situ Monitoring of Biomass in Submerged Cultivations, *Trends in Biotechnology*, 15, 517-522.

Omolara Racheal, O., 2015. Extraction, Purification and Characterization of Protease from *Aspergillus niger* Isolated from Yam Peels. *Int. J. Nutr. Food Sci*. 4, 125.

Papagianni, M., Sergelidis D. 2014 Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*, *Appl Biochem Biotechnol*, 172:3926–3938.

Porto A.L.F., Campos-Takaki G.M., Filho J.L.L 1996 Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. *Appl Biochem Biotechnol* 160:115–122.

Salihi, A Asoodeh A., Aliabadianb,M. 2017. Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93 *International Journal of Biological Macromolecules*, v., 2017, p. 827–835.

Sampaio e Silva, T.A.; Knob, A., Tremacoldi C. R., Brochetto-Braga, M.R.; Carmona, E.C. 2011 Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. *World J. Microb Biot* 27, 2491-2497.

Savitha S., SadhasivamS, Swaminathan K., Lin, FengHuei. 2011 Fungal protease: Production , purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42, 2,288-304.

Shankar, S., Rao, M., Laxman, R.S 2011. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. *Process Biochemistry*, 46, 579–585.

Shirasaka, N., Naitou, M. Kazuki Okamura, Mizuho Kusuda, Yasuhisa Fukuta, Takao Terashita 2012 Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. *Mycoscience* , 53, 5,354-364.

Siala, R., Sellami-Kamoun, A., Hajji, M., Abid, I., Gharsallah N., and Nasri, M 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization *African Journal of Biotechnology* 8 (18) 4582-4589.

Siddalingshwara K.G., Karthic, J., SunilDutt P.L.N.S.N. ,Pramod T. , Vishwanatha T. 2014. An approach on isolation, screening and production of protease from *Aspergillus oryzae* *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 4(2),86-89.

Statsoft Inc. Statistica (Data Analysis Software Systems) Version 8.0, 2008.

Souza, P. M., Aliakbarian, B., Ferreira Filho, E. X., Magalhães P. O., PESSOA Jr, A., Converti, A. 2015. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus* Journal of Biological Macromolecules, v.81, p. 17–21.

Vojcic L, Pitzler C., Körfer G., Jakob F., Ronny Martinez, Maurer K.H., 2015 Advances in protease engineering for laundry detergents. N Biotechnol. 25;32(6):629-34.

Yadav, S K., Bisht, D., Tiwari, S., Darmwal, N. S. 2015 Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant Biocatalysis and Agricultural Biotechnology 4, 4. 667–677.

Zaferanloo, B.; Quang, T. D.; Daumoo, S.; et al. 2014. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 30, 6, 1755-1762.

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, v.46, 11, 2137–214.

CAPITULO II

Integration of an aqueous two-phase system with varied chromatographic methods to the partial purification of a protease produced by *Aspergillus tamari* UCP 1279

Patyenne Carvalho Correia¹, Wendell Albuquerque¹, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa¹, ,
Tatiana Souza Porto², Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Department of Morphology and Animal Physiology (DMFA), Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brazil.

²Laboratories Center (CENLAG), Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Academic Unit of Garanhuns, Garanhuns, PE, Brazil.

*Corresponding author:

Ana Lúcia Figueiredo Porto, Rua Dom Manoel de Medeiros, Dois Irmãos 52171-900, Recife-PE, Brazil. Phone: +55.81.3320.6345. Email adress: anaporto@dmfa.ufrpe.br

Grant Sponsor:

FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco).

ABSTRACT

An extracellular protease enzyme was partially purified from a crude extract obtained from submerged fermentations by *Aspergillus tamaris* UCP 1279 isolated from the Caatinga soil. The extract was successively purified and the purification process was composed by various steps, which included primarily an aqueous two-phase extraction (ATPS) followed by ion exchange and size-exclusion chromatography in a Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) system. In each step of processing, the enzyme activity was estimated by assays based on the azocasein hydrolysis. In a PEG/Citrate system composed of 24% (w/w) PEG 400 and 20% (w/w) citrate, at pH 6 the proteases preferably partitioned to the top phase, resulting in a 146% recovery and a 1.6-fold increase in specific activity. The purification by the FPLC system chromatography (using a DEAE-FF column) provided one major peak with a protease specific 580 U/mg, whilst the gel filtration provided 200 U/mg. The best purification allowed protocols was ion-exchange chromatography associated with ATPS, which allowed for a 8 fold purification yield and a 12.5% recovery of the protease. These results show that ATPS could be combined with other chromatography methods to obtain enzyme purification in considerable levels.

1 INTRODUCTION

Proteases are multifunctional enzymes highly used in industry, accounting for almost 60% of this market. They have currently been widely applied in food, detergent and pharmaceutical industries and their extraction and purification processes have been focus of recent researches for new strategies in the downstream processing to obtain fast, low-cost, efficient, and simple gain of the target biomolecule (Ramakrishna et al., 2010; Yin et al., 2013).

Among many methods for separation and purification of protease, precipitation of enzymes is a useful method of concentration and used as initial step of purification. Precipitations by ammonium sulphate, ethanol, acetone or salts are the main methods used, not with standing the known protein denaturation and loss of protein functions (Siala et al., 2009; Niyoenzima and More, 2015).

Aqueous Two-Phase System (ATPS) is an alternative and versatile technique, consisting of two immiscible aqueous liquid phases which form under critical concentration; the systems can be composed by a polymer rich top phase and a salt or second polymer rich bottom phase (Zaslavsky, 1994). Its relative simple execution is considered an advantage, being employed particularly in the first step of purification of proteins as an alternative tool related to others traditional methods. As a recovery technique, it permits that, with an unique step, can be possible to integrate various techniques of protein processing, such as clarification, concentration and partial purification (Bernardo et al., 2014).

Although ATPS have been applied for recovery of a wide variety of biomolecules, its combination with chromatographic methods is yet not often reported to partitioning and purification of enzymes produced by fungi. Thus, protease partitioning and clarification behavior through aqueous two-phase system (using PEG-citrate) associated with gel chromatography was investigated, in order to obtain a high degree of purification.

In general, every method of purification has its own limitations and disadvantages. Combination of aqueous two-phase system (ATPS) with chromatographic method could be used as an option in which the ATPS provides an integration of the initial separation steps in the protein purification process and permits simplifying of the chromatography. As complementary techniques we have associated in this work the use of ATPS with both ion-exchange and gel filtration chromatography to

determine the best conditions of purification of a protease from *Aspergillus tamari* UCP 1279.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Microorganism and Crude extract

The filamentous fungi *Aspergillus tamari* was isolated from the Caatinga soil, PE-Brazil. It was maintained on Czapek medium at 30°C for 7 days and stored in mineral oil. The crude extract was obtained by submerged fermentation using soybean medium as substrate following the method described by Porto et al.(1996). Enzyme extraction was performed after 72 h of fermentation. The fermented samples were centrifuged at 9000 x g at 4°C for 10 min, and the supernatant was used as crude enzyme.

2.2 Purification steps

2.2.1 Aqueous two-phase systems

PEG/citrate two phase system was prepared at 25°C in 15 mL graduated tubes. The masses of sodium citrate, citric acid and PEG were determined by weighing the solid forms, in order to achieve the desired composition (PEG/Citrate composed of 24% (w/w) PEG 400 and 20% (w/w) citrate, at pH 6).The required solution amount was mixed with crude enzyme representing 20% (w/w).Water was added to bring the final mass to 10g. After 1 min of vortex shaking the top and bottom phases were separated by allowing settling for 60 min and their respective volumes (V_{top} and V_{bottom} phase) measured for the subsequent determination of protein concentration and protease activity. The system was analyzed against blank systems in order to avoid interference from the phase forming components. Blank top and bottom phase were prepared using the same procedure described above but adding water instead of the crude extract.

2.2.2 Enzyme purification by ion-exchange chromatography

The pre-purified extract was tested through two columns for ion-exchange chromatographic methods. In the former we used DEAE - Sephadex A-50, equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. In this case, the samples were eluted with the same

buffer containing 0.3 M, 0.6 M and 1M NaCl solution. The protein-containing fraction was pooled, and the enzyme solution concentrated for further analysis, the process was monitored at 280 nm absorbance. The second column used was a HiTrap DEAE-FF equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8. The adsorbed material was eluted with a 0.3 M NaCl solution. For both procedures, fractions of 1.0 ml were collected at a flow rate of 1 ml/min after elution. Protein content at 215 nm and protease activity in each fraction were measured spectrophotometrically. Fractions showing protease activities were pooled.

2.2.3 Gel filtration chromatography

Fractions containing protease activity from DEAE were pooled, and then loaded on gel filtration analysis by using Tris-HCl buffer, pH 8.0, with 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.

2.3 Electrophoresis and protein staining

The method of SDS-PAGE according to Laemmli (1970) was performed under non-reducing conditions with a 12% resolving gel and a 5% stacking gel, with previous samples dialysis and lyophilization. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue. The molecular weight of the protein band was estimated by comparison with the standard molecular weight markers. The calibration curve was plotted by the relation of the mobility of bands of the standard molecular weight markers against the logarithm of their molecular weight. For the protein staining the gel was incubated for 72h at room temperature in the Coomassie Brilliant Blue solution under gentle shaking in the dark. Proteins bands were identified as clear zones on the blue background on the gel.

2.4 Protein Determination

Protein content was determined by the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Each experiment was performed in triplicate, and the results were expressed as mean values.

2.5 Protease Activity Assay

Protease activity determination was performed at 25°C as described by Ginther (1979). The reaction was carried out with 0.250 mL of 1.0% Azocasein (Sigma, ST. Louis, Mo) as substrate in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.2, containing 1.0 mM CaCl₂. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that produced an increase in the optical density of 0.1 per hour at 420 nm. The analyses were done in triplicate.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Protease extraction in aqueous two-phase system

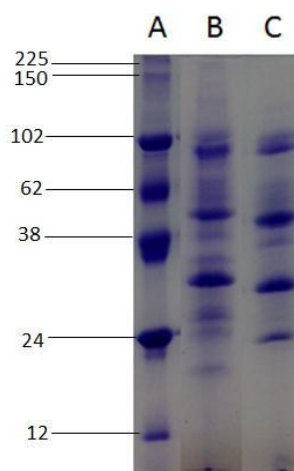
Extraction by ATPS was performed by using PEG/citrate system. This method permitted simplification and integration of purification processes of extraction, clarification and concentration of protease extract instead of others multi-step methods reported, such as centrifugation or filtration (Shirasaka et al., 2012), ammonium sulphate precipitation (Abirami et al., 2011), ethanol (Zanphorlin et al., 2011) and dialysis (Dubey et al., 2010). Conditions of ATPS were chosen based on preliminary analyses (results not shown). Purification process is summarized in Table 1.

Table 1. Successive purification steps of protease from *Aspergillus tamaritii* UCP 1279.

Purification step	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Fold
Crude Extract	696	9.60	72.5	100	1.0
ATPS- PEG 400	1020	9.0	113	146.5	1.6
DEAE Sephadex A50	160	0.32	500	22.9	6.9
Hitrap DEAE ff	87	0.15	580	12.5	8.0
Superdex G75(gel filtration)	60	0.30	200	8.6	2.8

Moreover, ATPS provided extraction, concentration, clarification and also some degree of purification (intermediary purification levels) of crude extract. This was observed by reduction of protein bands in electrophoresis gel, as shown in Figure 1. At PEG phase, protease was 1.6 fold purified, with a yield of 146.5%.

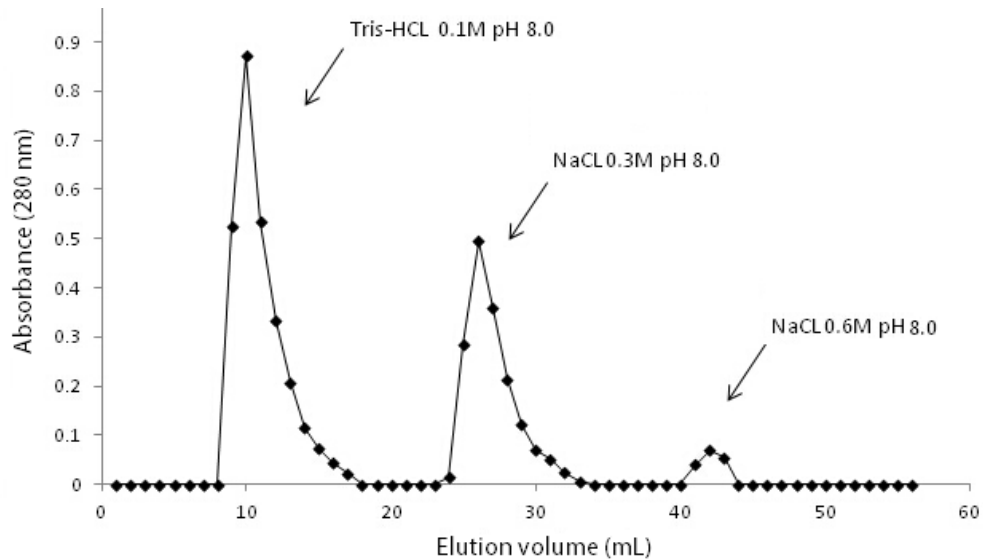
Fig 1. Electrophoretic analysis of protease from *Aspergillus tamari* for molecular weight determination: (A) lane 1: mass market proteins. (b) lane 2: crude extract, (C) partially purified protease after the aqueous two phase extraction.



3.2 Ion exchange chromatography

Following the separation by ATPS the top phase concentrate was further purified by using DEAE-Sephadex A-50. The enzyme extract was eluted with a NaCl solution at concentrations of 0.3 and 0.6 M NaCl, which provided 6.8 fold purity and 3.3% recovery (peak activity at 0.3 M, as shown in Fig.2). In this step, a considerable amount of pigments, still present in the extract, kept retained in the non-adsorbed fraction (together with the enzyme). Thus, the highly active fractions were pooled and further purified with a HiTrap DEAE-FF column (eluted by a linear gradient of 0.3 M NaCl), resulting in an unique peak with protease activity in the chromatogram (Fig. 3A). This second step of purification provided a 12.5% recovery and 8 fold purity, when compared to the crude extract. These indexes of purification are similar or higher than the those reported obtained by Racheal (2015) using ion-exchange (DEAE column) and gel filtration (Sephadex G-200) chromatography who, obtained 9.9 fold and 11% of recovery of a protease from *Aspergillus niger* by Muthulakshmi et al. (2011) who purified a protease from *Aspergillus flavus* obtaining 5.8 fold and 3.2% recovery by using a DEAE Cellulose Column Chromatography; and by Yin et al. (2013) who obtained of 3 fold and 46% recovery using a DEAE Sephacel column a protease from *Aspergillus oryzae*.

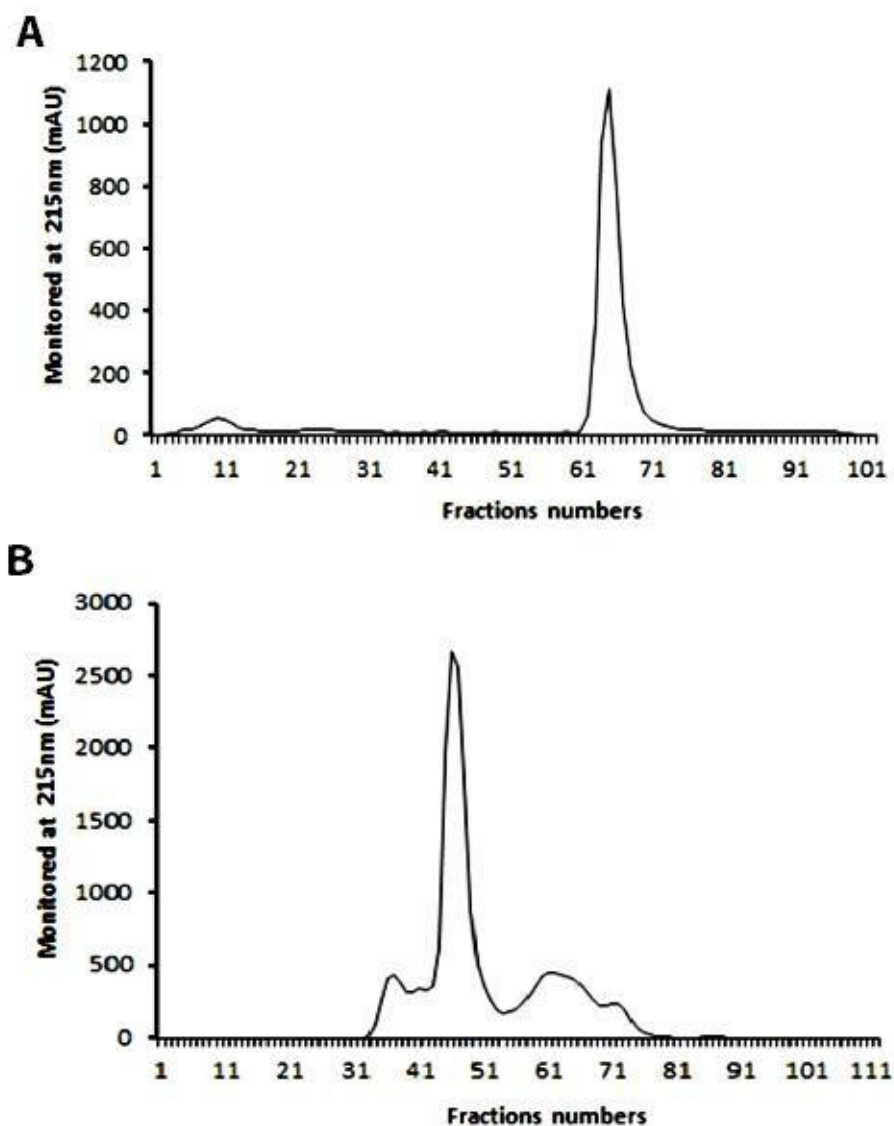
Fig 1. Chromatographic profile of a protease from *Aspergillus tamari* UCP 1279. Anion exchange chromatography was performed using a DEAE-A-50 column equilibrated with 0.1 Tris-HCl buffer (pH 8) and eluted with NaCl solution (0.3 and 0.6 M as the chromatogram peaks).



3.3 Gel filtration chromatography

Fractions pooled from HiTrap DEAE-FF containing protease activity were loaded on Superdex 75 (HR10/300) column pre-equilibrated with 0.1M Tris-HCl pH 8 buffer. Chromatogram provided a major peak with protease activity, corroborating with results obtained in ion-exchange chromatography, although large basis of peaks shows presence of more contaminants (Fig. 3B). After final purification step, protease enzyme was 2.8-fold purified with a recovery of 8.6% and specific activity of 200 U/mg. Gel filtration association with other purification methods has efficacy proved when, for example, Gessesse et al. (2003) have obtained 22.6-fold purity with 18% recovery of a protease from *Bacillus pseudofirmus*. To this goal, they have associated methods of ammonium sulfate precipitation, DEAE-Sepharose ion exchange chromatography and Sephadex G-75 gel filtration chromatography.

Fig 2. (A) Elution profile for ion-exchange chromatography of protease on a HiTrap DEAE-FF column (5x1 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and eluted by 0.3 M NaCl; (B) gel filtration chromatography on Superdex 75 (30x10 cm) equilibrated with 0.1 M Tris-HCLA buffer (pH 8.0) supplemented with 0.15M NaCl.



3.4 Efficiency of the ATPS association with chromatographic methods

ATPS provided the integration of the first steps of enzyme purification as extraction, concentration, clarifying and intermediary purification. Efficiency of extraction by ATPS method was evidenced by chromatography, which showed major peaks with protease activity and presence of a low amount of contaminants. Purification

by system chromatography (using a DEAE-FF column) provided one major peak, which was tested to have high protease activity per protein amount (580 U/mg). A unique major peak (at 215 nm) was also observed in gel filtration chromatography, proving that ATPS could be associated with various chromatography steps still providing good purification resolution. The combination of ATPS with chromatographic methods is rarely reported in the purification of proteases, although it was already tested for many other biomolecules. Zhao et al. (2015) reported high purity (90%) when associated the ATPS containing salts and hydrophilic alcohols to two chromatographic steps using D101 macroporous resin and inexpensive SKP-10-4300 reverse-phase resin, for the purification of Capsaicin from *Capsicum oleorisin*. Puthirasigamany et al. (2014) have combined the ion exchange and hydrophobic exchange membrane chromatography with different concentration of polyethylene glycol (PEG), salt and protein obtaining a total product recovery of 99.9% for the purification of monoclonal antibody.

4 CONCLUSION

Integration of chromatography and aqueous two-phase system allowed a good degree of purification of protease from *Aspergillus tamaritii* UCP 1279. Purification protocol proposed in the present study is a viable alternative for preliminary separation stages, especially in aqueous two phase system to minimize protein concentration. Enzyme was purified from culture supernatant by four steps (ATPS, 2 ion-exchange chromatography and molecular exclusion) with a 2.8 fold increase in specific activity and 8.6% recovery. Use of ATPS to simplify initial steps of enzyme was effective and allows an efficient integration with further chromatographic steps, providing a considerable degree of purification. Combination of methods was herein proved to be applicable for protease purification.

5 ACKNOWLEDGMENTS

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

6 REFERENCES

Abirami, V., Meenakshi, S.A., Kanthymathy, K., Bharathidasan, R., Mahalingam, R., Panneerselvam, A., 2011. Partial purification and characterization of an extracellular xylanase from *Penicillium janthinellum* and *Neurospora crassa*. J. Nat. Prod. Plant Resour 1, 117–125.

Bernardo, S.C., Azevedo, A.M., Aires-Barros, M.R., 2014. Integrated platforms for the clarification and capture of monoclonal antibodies. Rev. Mex. Ing. Química 13, 349–357.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Dubey R., Adhikary, S., Kumar, J., Sinha N. 2010. Isolation, production, purification, assay and characterization of alkaline protease enzyme from *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents, Developmental Microbiology and Molecular Biology 1, 75-94.

Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., Mattiasson, B., 2003. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme Microb. Technol. 32, 519– 524. doi:10.1016/S0141-0229(02)00324-1

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

Muthulakshmi, C., Gomathi, D., Kumar, D.G., Ravikumar, G., Kalaiselvi, M., Uma, C., 2011. production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. Jordan J. Biol. Sci. 4, 137–148.

Niyonzima F.N.; More, S.S. 2015. Purification and characterization of detergent-compatible protease from *Aspergillus terreus* gr. 3 Biotech. 51, 61–70.

Omolara Racheal, O., 2015. Extraction, purification and characterization of protease

from *Aspergillus Niger* isolated from Yam Peels. Int. J. Nutr. Food Sci. 4, 125. doi:10.11648/j.ijnfs.20150402.11

Porto, A.L.F., Campos-Takaki, G.M., Lima Filho, J.L., 1996. Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. Appl. Biochem. Biotechnol. 60, 115–122. doi:10.1007/BF02788066

Shirasaka , N., Masao N., Okamura, K., Kusuda, M., Fukuta, Y., Terashita, T 2012. Purification and characterization of a fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3, Mycoscience , 53, 354-364. doi: 10.1007/s10267-011-0179-3

Siala, R.; Sellami-Kamoun, A.; Hajji, M.; Abid, I., Gharsallah, N.; Nasri, M. 2009. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization African Journal of Biotechnology v. 8 (18), pp. 4582-4589, 15.

Puthirasigamany, M., Hamm, I., van Winssen, F.A., Nikbin, N., Kreis, P., Gorak, A., Zeiner, T., 2014. Purification of biomolecules combining ATPS and membrane chromatography. Food Bioprod. Process. 92, 152–160. doi:10.1016/j.fbp.2014.03.006

Ramakrishna, V., Rajasekhar, S., Reddy, L.S., 2010. Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. Appl. Biochem. Biotechnol. 160, 63–71. doi:10.1007/s12010-009-8523-1

U. K. Laemmli, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680–685.

Yin, L.-J., Hsu, T.-H., Jiang, S.-T., 2013. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. J. Agric. Food Chem. 61, 662–6. doi:10.1021/jf3041726

Zaslavsky, B. Y., Aqueous Two-Phase Partitioning: Physical Chemistry And Bioanalytical Applications, Marcel Dekker, INC., USA 1994.

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 Biochem.* 46, 2137–2143. doi:10.1016/j.procbio.2011.08.014

Zhao, P., Lu, Y., Tan, C., Liang, Y., Cui, B., 2015. Aqueous two-phase extraction combined with chromatography: new strategies for preparative separation and purification of capsaicin from *Capsicum Oleoresin*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 175, 1018–1034. doi:10.1007/s12010-014-1303

CAPÍTULO III

Aplicação de uma enzima fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* e sua análise estrutural

Thiago Pajeú Nascimento¹; Patyenne Carvalho Correia²; Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa², Maria Teresa da Cruz Augusto Neves Petersen³, Attilio Converti⁴, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil.

³Departamento de Medicina, Universidade de Aalborg, Aalborg-Dinamarca

⁴Departamento de Engenharia Civil, Química e Ambiental, Polo de Engenharia Química, Universidade de Gênova, Gênova-Itália.

*Corresponding author: analuporto@yahoo.com

Grant Sponsor:
FACEPE (Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco)

RESUMO

Neste estudo uma protease com atividade fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* foi utilizada para avaliar a capacidade de degradação do fibrinogênio e seus efeitos sobre a coagulação em particular sobre os tempos de protrombina (TP) e Tromboplastina parcial ativada (TTPa). Foram realizados também testes de estabilidade frente a diferentes solventes e teste de prateleira. As cadeias α e β do fibrinogênio foram completamente degradadas nos primeiros 20 minutos de incubação. Os solventes testados apresentaram um efeito estabilizador diferenciado na atividade enzimática, sendo ela mais estável na presença de acetato de etila e menos estável na presença de etanol. Nos testes de anticoagulação, o TTPa foi prolongado com o passar do tempo, sugerindo a inibição da via intrínseca e/ou comum; quando associada com o íon Mg^{2+} , apresentou um tempo ainda maior de prolongamento, No TP não houve alteração com o passar do tempo ou aumento da concentração da enzima. A protease fibrinolítica a temperatura de 4 °C mostrou ser muito mais sensível a estabilidade da atividade fibrinolítica apresentando (33,14%) de atividade residual passado um ano de análise, já a temperatura de 25 °C que conservou cerca de metade (48,66%) da atividade enzimática. A enzima estudada mostrou ter potencial para o desenvolvimento de formulação de medicamentos terapêuticos.

Palavras chave: *Mucor subtilissimus*, protease fibrinolítica, trombo

1 INTRODUÇÃO

O mecanismo de coagulação sanguínea é constituído por uma cascata acompanhada de diversos fatores, o que melhora a eficiência da coagulação, funcionando como um mecanismo defensivo essencial para os corpos vivos (Kubota et al., 2004). As patologias que interferem nessa cascata, como as doenças do sistema cardiovascular (infarto agudo do miocárdio, acidente vascular encefálico, doença cardíaca coronariana, hipertensão e aterosclerose), altera o mecanismo de coagulação e atualmente estão entre as principais causas da mortalidade humana em todo o mundo (Girón, et al., 2013).

A fibrina, o principal componente estrutural do coágulo sanguíneo, é formado pela proteólise da trombina sobre o fibrinogênio (Choi et al., 2014). O fibrinogênio é uma glicoproteína em forma de vara com peso de $3,4 \times 10^5$ g/mol que tem uma estrutura estérica única se reunindo em uma rede de gel tridimensional, pela ação da trombina através da remoção do fibrinopeptídeo A e B (Kubota et al., 2004). É composta por três pares de cadeias polipeptídicas ($A\alpha$, $B\beta$ e γ), com massas moleculares de 66, 55 e 48 kDa (Greenberg, 1994).

Para o estudo de macromoléculas biológicas, em particular de proteínas, técnicas de espectroscopia como dicroísmo celular e fluorescência, são empregadas para conhecer a conformação das proteínas, ligada a sua função biológica, e para elucidar sua estrutura nativa afim de desenvolver um produto terapêutico e ser aplicado na indústria farmacêutica (Dobson, 2000).

No presente estudo, examinamos as propriedades da protease fibrinolítica sobre a coagulação e seus efeitos sobre TP e TTPa, a estabilidade da enzima quanto a influência de solventes orgânicos e sua atividade fibrinogenolítica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Enzima fibrinolítica

Uma protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* isolado do solo da Caatinga foi purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A50 (25 x 12 x 2,0 cm) equilibrada com tampão de fosfato de sódio 125 mM, pH 7,0. A coluna foi eluída com o mesmo tampão a um fluxo de 0,5 mL/min e suspenso em 3 mL de fosfato de sódio 245 mM (pH 7,0-7,2).

2.2 Determinação da atividade fibrinolítica

A atividade fibrinolítica foi determinada quantitativamente utilizando o método espectrofotométrico descrito por Wang et al (2011). Primeiro, colocou-se 0,4 mL de fibrinogênio a 0,72% em um Eppendorf com 0,1 mL de tampão fosfato 245 mM pH 7 e incubou-se a 37 °C durante 5 min. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de uma solução de trombina a 20 U/mL. A solução foi incubada a 37 °C durante 10 min, posteriormente foi adicionado 0,1 mL da protease fibrinolítica e a incubação continuou a 37 °C. Esta solução foi novamente misturada após 20 e 40 min. Ao fim de 60 minutos, adicionou-se 0,7 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,2 M e misturou-se. A mistura da reação foi centrifugada a 15 000 xg durante 10 min. Em seguida, recolheu-se 1 mL do sobrenadante e mediu-se a absorbância a 275 nm. Neste ensaio, 1 unidade de atividade de degradação da fibrina, (UF) é definida como um aumento de 0,01 por minuto na absorbância a 275 nm.

2.3 Atividade fibrinogenolítica

A atividade fibrinogenolítica foi medida de acordo com o descrito por Parl et al., (2013). Para o ensaio incubou-se a 37 °C um total de 200 µL de mistura da reação consistindo em 100 µg de fibrinogênio e 5 µg da protease fibrinolítica purificada em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 7,5); toda essa mistura foi realizada em um tubo de micro centrífuga. Foram retirados 20 µL dessa mistura de reagentes nos tempos de 0, 1, 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 240 min. A reação foi interrompida pela adição de 4 uL de tampão de amostra SDS-PAGE 6X e aqueceu-se a 100 °C durante 3 min. Os produtos resultantes (10,5 µg) foram analisados por SDS-PAGE como descrito por Chang et al.,(2005).

2.4 Efeitos da albumina sérica na atividade enzimática.

A mistura da reação (90 µL) foi composta por 0,5 µg da enzima fibrinolítica com 6,7 mg/mL de BSA (Soro Albumina Bovina) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5) contendo NaCl 150 mM. Após adição de 10 µL de substrato cromogênico (4 mM), a absorbância a 405 nm foi monitorada a 37 °C durante 20 min de acordo com Parl et al., 2013. Neste ensaio, a atividade enzimática foi expressa como atividade relativa e comparada com a do controle (amostra não tratada com a enzima fibrinolítica).

2.5 Influência de solventes orgânicos sobre a atividade da enzima fibrinolítica e sua estabilidade.

As preparações foram incubadas com os seguintes solventes: Éter etílico, acetato de etila, etanol, acetona, isopropanol, acetonitrila e metanol, todos na concentração de 20% (v/v) a 37 °C durante 30 min. As atividades enzimáticas restantes foram medidas sob condições de ensaio normais, essa atividade foi feita de acordo com Hassanein et al. (2011). Neste estudo, o tampão fosfato (pH 7) foi utilizado como controle e os efeitos de vários solventes orgânicos sobre a estabilidade da enzima fibrinolítica foram investigados a 4 °C e a temperatura ambiente (25 °C) durante 0 e 30 dias.

2.6 Tempo de prateleira da enzima fibrinolítica

Foi analisado o tempo de prateleira, ou seja, a durabilidade da atividade da enzima fibrinolítica com o passar do tempo (0, 7, 15, 20, 30, 60, 120, 240 e 365 dias) e de acordo com a temperatura de acondicionamento: temperatura ambiente (25 °C) e 4 °C . A enzima foi mantida liofilizada e nos tempos determinados resuspendidas utilizando NaCl. Em cada tempo e temperatura foram retiradas amostras para a determinação da atividade fibrinolítica.

2.7 Ensaios de Espectroscopia de fluorescência de estado estacionário

Para a espectroscopia de fluorescência em estado estacionário foram preparadas soluções de 0.2 mg/mL, equivalente a 10 μ M de proteína, a diferentes valores de pH: 4, 5, 6, 7.2, 8, 9 e 10. Os tampões utilizados foram: acetato de sódio 0,1 M ($4 \leq \text{pH} \leq 5$); fosfato de sódio 0,1 M ($6 \leq \text{pH} \leq 8$) e glicina ($9 \leq \text{pH} \leq 10$).

Os espectros de excitação da proteína foram obtidos fixando o comprimento de emissão a 337 nm. Os espectros de emissão foram obtidos excitando a proteína a 280 nm. Estes espectros destinam-se a analisar a fluorescência intrínseca de resíduos de Trp, Tyr e Phe na proteína. A iluminação das soluções enzimáticas foi realizada utilizando um espectrômetro Felix, RTC 2000 (Photon Technology International Consortium Court London, Ontário), utilizando uma lâmpada de arco de Xenon de 75 W acoplada a um monocromador. Todos os espectros foram recolhidos utilizando abertura de fenda de excitação de 0.25 mm e abertura de fenda de emissão de 6 mm. Foram analisados espectros de excitação de fluorescência e emissão da protease fibrinolítica antes do

aquecimento a 20°C, após aquecimento a 80°C e após arrefecimento a 20°C novamente para cada pH. Para obter os espectros finais das amostras, os respectivos espectros do tampão foram subtraídos do espectro da amostra. Quando necessário, os espectros foram normalizados utilizando o software Origin 8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA), de modo a analisar alterações espectrais.

2.8 Dicroísmo circular

Para os ensaios de dicroísmo circular (CD) foram usadas amostras preparadas exatamente da mesma forma para a esoelectroscopia de fluorescência em estado estacionário.

A monitorização e quantificação de estruturas secundárias na proteína fibrinolítica foi feita por CD a diferentes valores de pH e a diferentes temperaturas. As medições foram realizadas utilizando um espectrofotômetro J815 CD (Jasco Incorporated, Easton, E.U.A.). Os espectros foram obtidos no intervalo de comprimento de onda entre 200 e 260 nm, sendo a elipticidade monitorada a cada 1 mm e usando um tempo de resposta de 2 sec a uma velocidade de escaneamento de 50 nm/min. As medições foram efetuadas a temperatura ambiente (20°C), após aquecimento (80°C) e após arrefecimento (20°C) para todos os valores de pH. Os espectros da protease fibrinolítica foram comparados para cada pH. O espectro CD do tampão foi subtraído do espectro da amostra.

A intensidade de elipticidade a 218nm de uma solução fresca da protease fibrinolítica, a cada pH, foi monitorada continuamente de 20°C a 80°C a uma taxa de aquecimento de 1°C/min. Este método permite determinar o ponto de fusão da protease fibrinolítica para cada pH e comparar estes resultados com os resultados obtidos por espectroscopia de fluorescência.

2.9 Determinação dos tempos de coagulação

As determinações dos tempos de coagulação, em particular foram estudados os tempos de protrombrina (TP) e tromboplastina parcialmente ativada (TTP), foram realizados em um coagulômetro semi-automático BFT II (Dade Behring). Para a obtenção do plasma, o sangue total de pacientes saudáveis, anticoagulado com citrato de

sódio 3,2%, foi obtido através de venopunção, e foi centrifugado a 1.726xg, por 15 min a 25°C. Os controles dos ensaios de TP e TT foram realizados com 50 µL de solução salina (NaCl, 0,9%) e 50 µL de plasma, incubados por 30 s, com subsequente adição de 100 µL do reagente (Thromborel S e Thrombin-Dade Behring).

O controle do ensaio de TTPa foi realizado com 50 µL de solução salina (NaCl, 0,9%), 50 µL de plasma e 50 µL do reagente para TTPa (Dade actin activated cephaloplastin reagent-Dade Behring), incubado por 120 s e subsequente adição de 50 µL de cloreto de cálcio 0,025 M. Para avaliação do efeito anticoagulante, a protease fibrinolítica foi utilizada em uma concentração de 1.0 mg/mL. Foi utilizada também a protease fibrinolítica suplementada pelo íon Mg^{2+} . Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos em função de R (razão tempo de coagulação da amostra sobre o tempo de coagulação do controle).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade fibrinogenolítica

O fibrinogênio é a molécula final na cascata de coagulação antes da deposição da fibrina o qual portanto a redução do nível de fibrinogênio, pode ter benefício na redução da incidência de trombose (Wang et al., 2011). Nesse sentido, o efeito da protease fibrinolítica produzida pelo *Mucor subtilissimus* UCP 1262 sobre o fibrinogênio foi analisado através de SDS-PAGE mostrando que o fibrinogênio foi fragmentado de uma maneira dependente do tempo (Figura 1). As cadeias α e β do fibrinogênio foram completamente degradadas nos primeiros 20 minutos de incubação (Figura 1B). Resultados menos satisfatórios foram apresentados por Pinto et al. (2004) e Mukherjee et al. (2008) que tiveram a clivagem da cadeia α de fibrinogênio dentro de 30 minutos de incubação.

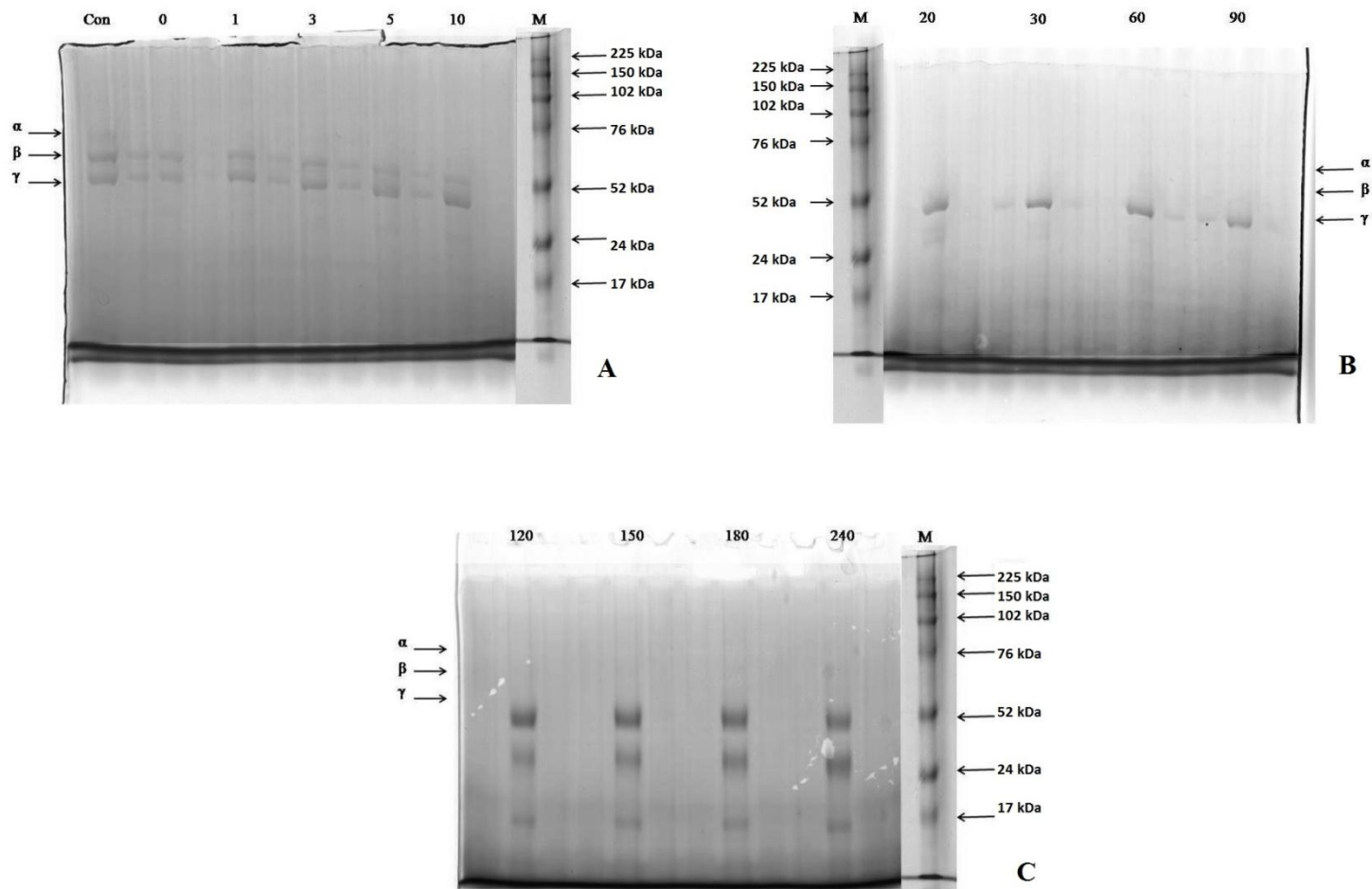
Diferentemente dos resultados apresentados por He et al., (2007), de acordo com nossos resultados a cadeia α foi degradada primeiro, seguida da degradação da cadeia β do fibrinogênio. Possivelmente como descrito por Pinto et al., (2004) ocorreu uma ação preferencial da protease fibrinolítica sobre as cadeias $A\alpha$ e $B\beta$ do fibrinogênio produzindo derivados que não podem ser bloqueados pela ação da trombina. Nossa protease fibrinolítica, assim como as enzimas fibrinolíticas extraídas do veneno de

Bothrops colombiensis (Girón et al., 2013) pode promover efeitos anti-coagulantes, uma vez que degradou as cadeias Aa e Bb de fibrinogênio.

A degradação dessas cadeias foi acompanhada pela formação de fragmentos de baixa massa molecular (entre 17 e 24 KDa).

A cadeia γ foi degradada mais lentamente, após 120 minutos de incubação (Figura 1C). Estes resultados podem ser considerados mais satisfatórios do que os relatados por Wang et al. (2011) que conseguiu a degradação da cadeia γ após 300 minutos pela ação de uma serino protease alcalina com atividade fibrinolítica. Essa capacidade de clivar eficientemente as cadeias γ de fibrinogênio é sugerido, por Park et al. (2013), como uma vantagem para remover os coágulos de fibrina in vivo.

Figura 1. Hidrólise do fibrinogênio pela protease fibrinolítica em função do tempo. A- Controle, 0, 1, 3,5 e 10 minutos; B – 20, 30, 60 e 90 minutos; C – 120, 150, 180 e 240 minutos. Durante os intervalos de tempo as amostras foram analisadas por SDS-PAGE a 12%.



3.2 Efeitos da albumina sérica na atividade enzimática.

Estudos realizados por Anderson et al. (1977) e Adkins et al., (2002) comprovaram que o plasma sanguíneo humano contém uma quantidade de proteínas normalmente em torno de 60-85 mg por mL; dentre essas destacam-se: a albumina (~ 55%), a globulina (~ 38%), o fibrinogênio (~ 7%), (pro) enzimas e inibidores da protease (menos de 1%).

Sabemos que a ação das proteases fibrinolíticas pode ser afetada por todos esses componentes citados acima que estão presentes no plasma sanguíneo, sendo assim, resolvemos analisar os efeitos do BSA na atividade enzimática da protease fibrinolítica produzida por *Mucor subtilissimus* UCP 1262. Na presença do BSA, a atividade amidolítica da protease, não sofreu qualquer diminuição significativa ($99,37\% \pm 0,023$) quando comparado, ao controle (sem BSA) que foi de 100%. Estes resultados discordam com os apresentados por Park et al., (2013) que na presença de BSA, observaram uma redução da atividade amidolítica das três enzimas estudadas, reduziram para uma média de 77,5%, em comparação com a do controle sem BSA.

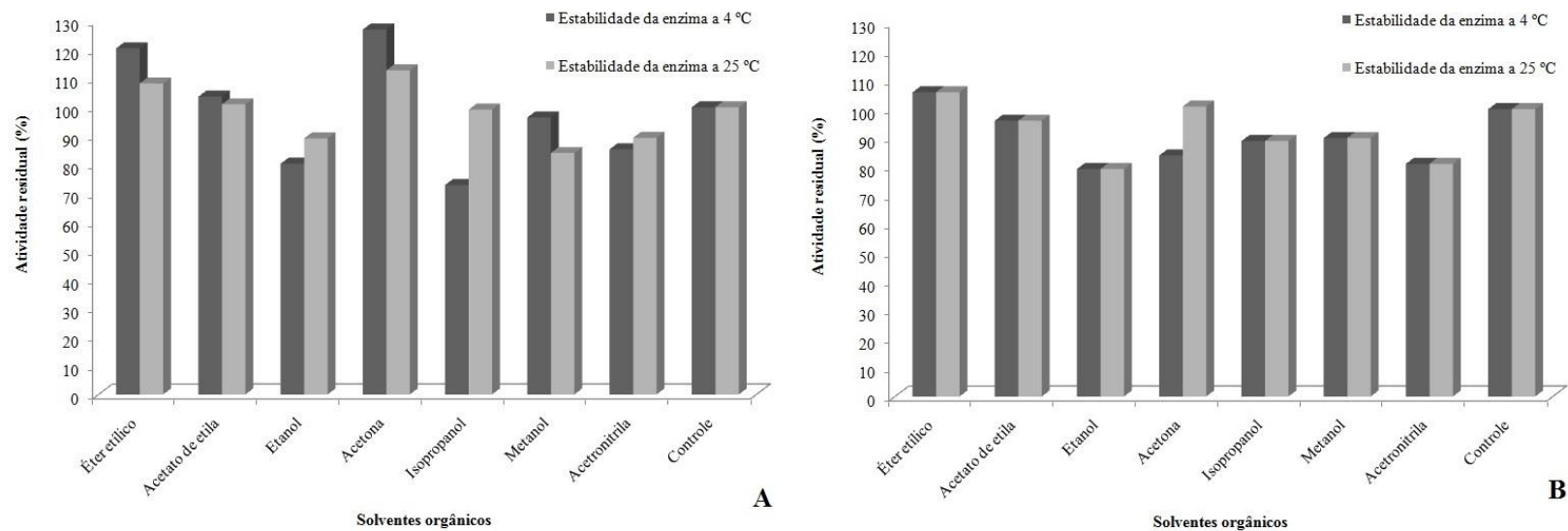
3.3 Influência de solventes orgânicos sobre a atividade da enzima fibrinolítica e sua estabilidade.

O efeito de diferentes solventes orgânicos (20%, v/v) sobre a estabilidade da protease fibrinolítica foi estudada. A atividade da enzima sem qualquer solvente (controle) foi tomada como 100%. Em geral, os solventes testados apresentaram um efeito estabilizador na atividade enzimática corroborando com os resultados apresentados por Hassanein et al., (2011) e Rai & Mukherjee, (2009). Essa estabilização da atividade provavelmente se deve a manutenção da configuração da enzima, sugerindo que a substituição de algumas moléculas de água por moléculas orgânicas em uma enzima pode estabilizar a sua estrutura (Gupta et al., 2005; Wang e Yeh 2006; Hassanein et al., 2011). Além disso, há uma grande demanda industrial para proteases tolerantes a solventes orgânicos para aplicação na síntese de produtos úteis na presença de solventes orgânicos (Gupta e Khare, 2007).

A protease fibrinolítica foi mais estável na presença de acetato de etila e menos estável na presença de etanol, para ambas as temperaturas testadas, diferentemente dos resultados apresentados por Hassanein et al., (2011) e Rai & Mukherjee, (2009), que

tiveram o etanol como um dos solventes mais estáveis para a atividade das suas proteases. De acordo com a Figura 2, após 30 dias, a protease fibrinolítica manteve mais de 80% da sua atividade inicial (efeito estabilizador), em todos os solventes utilizados tanto para a temperatura ambiente de 25 °C quanto para a temperatura de 4 °C.

Figura 1 Efeito de vários solventes orgânicos na estabilidade da enzima a 25 ° C e 4° C, com 0 dias (A) e com 30 dias (B). Cada valor representa a média de três ensaios.



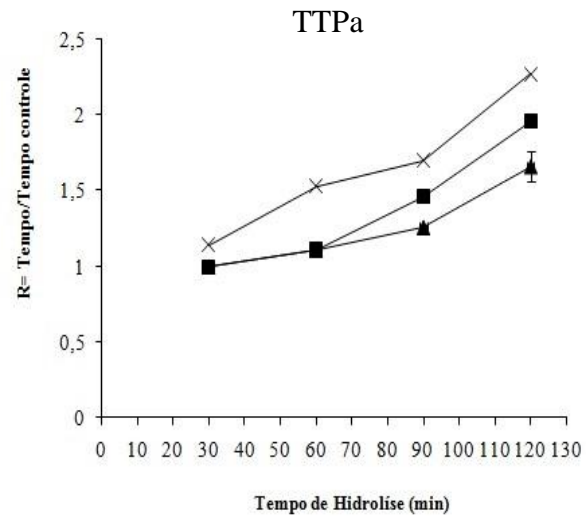
3.4 Determinação dos tempos de coagulação

As atividades anticoagulantes da protease fibrinolítica foram examinadas em termos de tempos de protrombina (TP) e de trombloplastina parcial ativada (TTPa) como motivo de investigar a capacidade da protease de bloquear os fatores de coagulação envolvidos na via extrínseca ou comum e via intrínseca (Lin et al., 2004), respectivamente. Embora as atividades anticoagulantes da protease fibrinolítica fossem mais fracas do que a da estreptoquinase (utilizada como padrão), pode ser observado na Figura 3A que o TTPa foi prolongado com o passar do tempo. Segundo Ku et al. (2014) tal prolongamento sugere a inibição da via intrínseca e/ou comum.

Já a enzima associada com o íon Mg^{2+} , mostram um prolongamento do TTPa ainda maior. A escolha desse íon se deve a estudos anteriores (dados não mostrados) que demonstram uma significativa melhora da atividade da protease fibrinolítica na presença desse íon.

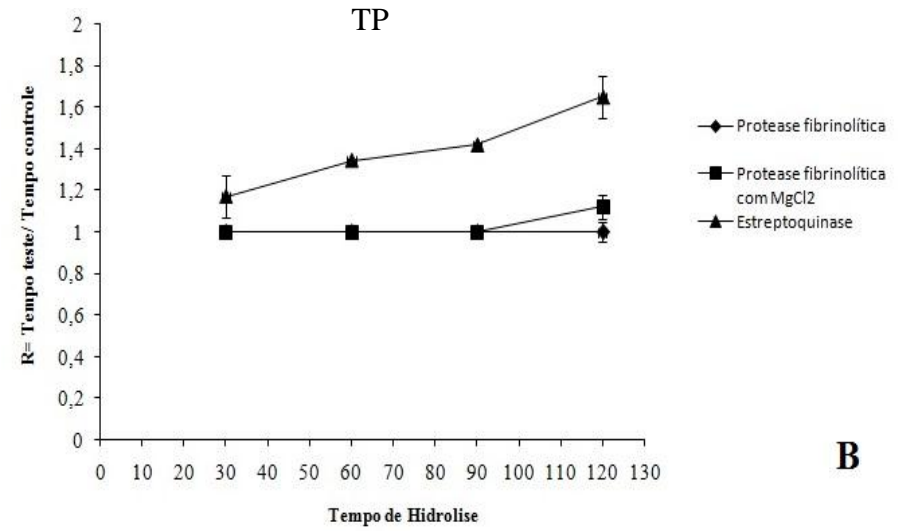
Com relação ao TP, esse foi menos sensível a variação do tempo, não ocorrendo prolongamento evidente, mesmo na maior concentração enzimática mais elevada (Figura 3B). Com base nos resultados de degradação do fibrinogênio (item 3.1), podemos inferir que a degradação do fibrinogênio pela protease fibrinolítica provavelmente alterou os locais de ação da trombina sobre o fibrinogênio ou afetou os sítios de polimerização necessários para a associação dos monômeros de fibrina (Brazón et al., 2014). Os resultados do prolongamento dos tempos TP e TTPa produzido pela protease fibrinolítica sugerem a perda da atividade coagulante da enzima e se assemelham aos relatados por outros autores, Brazón et al., 2014; Richardson and Sanchez, 2006; Francischetti et al., 2003.

Figura 2. A - Atividade anticoagulante da enzima. O tempo de coagulação do sangue foi medido I TP mpo de trombina parcial ativa (TTPa) e B - Tempo de protrombina (TP).



▲ Protease fibrinolítica
 ■ Protease fibrinolítica com MgCl2
 × Estreptoquinase

A



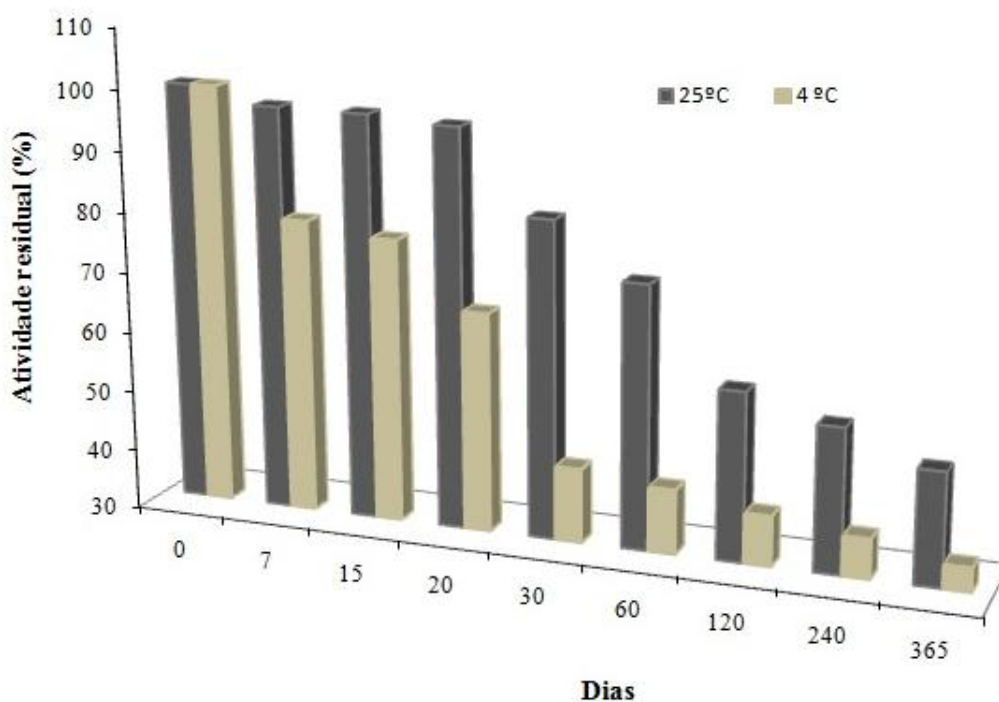
◆ Protease fibrinolítica
 ■ Protease fibrinolítica com MgCl2
 ▲ Estreptoquinase

B

3.5 Tempo de prateleira

Sabe-se que as estruturas não nativas ou parcialmente desdobradas das proteínas resultam em sua agregação, precipitação ou degradação química acelerada, podendo levar a um curto prazo de validade (W. Wang, 2000; W. Wang, 1999). Desde então, diversas questões foram abordadas durante o processo de formulação, liofilização e estabilidade para a melhor forma de armazenagem de proteínas em longo prazo (Heller et al., 1999; Wei et al., 1991; J. Liu, 2006; Passot et al., 2005). Nesse sentido procurou-se analisar a estabilidade da protease fibrinolítica em duas temperaturas ao longo de um período de 1 ano. Na Figura 3 é possível observar que a temperatura de 4 °C mostrou ser muito mais impactante a estabilidade da atividade fibrinolítica, chegando ao total de 33,14% de atividade residual passado um ano de análise. Ao contrário, na temperatura de 25 °C foi conservada cerca de metade (48,66%) da atividade enzimática.

Figura 3. Estabilidade da protease fibrinolítica em diferentes temperaturas (4 e 25°C ao longo de um ano.

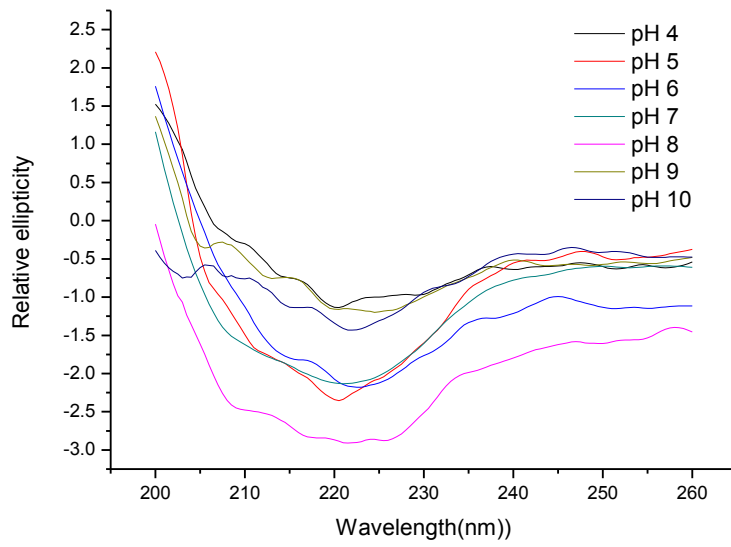


3.6 Dicroísmo Circular

O dicroísmo circular (circular dichroism - CD) é um método espectroscópico óptico que explora a absorção diferencial de luz circulamente polarizada da luz circularmente polarizada direita e esquerda por moléculas opticamente ativas, visando determinar as suas configurações absolutas (Miles e Wallace, 2015). No presente estudo, a enzima fibrinolítica previamente purificada de *Mucor subtilissimus* foi submetida à análise dos espectros de CD frente a variações físico-químico, de temperatura e pH. A Figura 5 apresenta os espectros da enzima obtidos em diferentes valores de pH. Os resultados foram obtidos na intensidade de comprimento de onda de 200 a 260 nm, à temperatura inicial de 20°C. Observa-se que em solução tampão Tris-HCl, pH 8,0, a enzima apresentou a estrutura que mais se aproxima da sua faixa de atividade ótima. Apesar de não apresentar os dados de deconvolução dos espectros, a faixa de absorbância 218-220 nm tendem a gerar características conformacionais do tipo β -folha. Em estudos de CD, a diferença de absorbância $A(l)-A(r)$ é muito pequena (0.0001), correspondendo a uma elipsidade de 1/100 de um grau. A espectroscopia de CD na faixa de comprimentos de onda do ultravioleta (UV) do espectro electromagnético (260-170 nm) pode ser usada para caracterizar e quantificar o conteúdo estrutural secundário da proteína em termos de estrutura α -helicoidal, β (β -folha) e desordenada. Também pode ser utilizado para identificar alterações que ocorrem devido a interações com ligandos ou outras porções ou fatores ambientais tais como alterações no pH e temperatura. Os sinais CD dos aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina são detectáveis na faixa de UV próximo entre 260 e 300 nm e podem ser utilizados para monitorar as alterações no ambiente destas porções, que podem refletir a estrutura terciária da proteína.

Ainda na Figura 5, os espectros obtidos nas escalas de pH com maior acidez e alcalinidade demonstram uma desordem estrutural da enzima bem como uma interferência na aquisição dos dados. Estudos prévios demonstram que nessas faixas de pH a enzima não apresenta boa atividade catalítica, corroborando com os dados descritos no presente estudo.

Figura 4. Espectro de dicroísmo circular obtenido para protease fibrinolítica a diferentes.



4 CONCLUSÃO

A protease fibrinolítica atua diretamente tanto no fibrinogênio, como no polímero de fibrina. Além disso, o demonstrou que a enzima possui uma longa vida de prateleira. Estudos futuros serão realizados para utilização dessa enzima, como um possível agente terapêutico eficaz, para o tratamento de doenças cardiovasculares ocasionadas por formação de trombos.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, et al. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 2002;1:947–55.

Anderson L, Anderson NG. High resolution two-dimensional electrophoresis of human plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977;74:5421–5.

Brazón, J., Guerrero, B., D'Suze, G., Sevcik., C., Carmen L. Arocha-Piñango. Fibrin(ogen)olytic enzymes in scorpion (*Tityus discrepans*) venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 168 2014, 62–69.

Choi, J-H., D-W Kim, S-E Park, B-S Choi, Kr Sapkota, SKim, and S-J Kim. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: Purification and partial characterization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2014; 118(4):372-7.

Francischetti, I., Mather, T., Ribeiro, J., Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)olytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003, 305, 869–875.

Girón, M. E., Guerrero, B. Salazar, A. M., Sánchez, E. E., Alvarez, M., Rodríguez-Acosta, A. Functional characterization of fibrinolytic metalloproteinases (colombienases) isolated from *Bothrops colombiensis* venom. *Toxicon* 74 (2013) 116–126.

Greenberg, C.S., 1994. Fibrin formation and stabilization. In: Loscalzo, J., Schafer, A.I. (Eds.), *Thrombosis and Hemorrhage*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 106–126

Gupta A, Roy I, Khare SK and Gupta MN 2005 Purification and characterization of a solvent stable protease from *Pseudomonas aeruginosa* PseA. *J. Chromatogr. A* 1069 155–161.

Hassanein, W. A., Essam Kotb, Nadia M Awny and Yehia A El-Zawahry. Fibrinolysis and anticoagulant potential of a metallo protease produced by *Bacillus subtilis* K42. *J Biosci.* 2011; 36(5):773-9.

Heller, M.C., Carpenter, J.F., Randolph T.W., Protein formulation and lyophilisation cycle design: prevention of damage due to freeze- concentration induced phase separation, *Biotechnol. Bioeng.* 63 (1999) 166– 174.

Ku S. K ., Jong-Sup Bae. Antiplatelet, anticoagulant, and profibrinolytic activities of withaferin A. *Vascular Pharmacology* 60 (2014) 120–126.

Kubota, K., Kogure, H., Masuda, Y., Toyama, Y., Kita, R., Takahashi, A., Kaibara, M. Gelation dynamics and gel structure of fibrinogen. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 38 (2004) 103–109.

Lin, W.C., Liu, T-Y, Ming-Chien Yang. Hemocompatibility of polyacrylonitrile dialysis membrane immobilized with chitosan and heparin conjugate. *Biomaterials* 25 (2004) 1947–1957.

Liu, J. Physical characterization of pharmaceutical formulations in frozen and freeze-dried solid states: techniques and applications in freeze-drying development, *Pharm. Dev. Technol.* 11 (2006) 3–28.

Miles A.J., Wallace B.A.. Circular dichroism spectroscopy for protein characterization: biopharmaceutical applications. *Biophysical characterization of proteins in developing. Biopharmaceuticals*, 2015, 109-137.

Mukherjee, A. K., Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing fibrinogenase and tissue hemorrhagic activity from venom of *Daboia russelli russelli* (Russell's viper): Evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. *Toxicon* 51 (2008) 923–933.

Park, J. W., Jung Eun Park, Hyun Ki Choi, Tae Won Jung, Seong Myeong Yoon,*, Jung Sup Lee. Purification and characterization of three thermostable alkaline fibrinolytic serine proteases from the polychaete *Cirriiformia tentaculata*. *Process Biochemistry*. 48, 5–6, 2013, 979–987.

Passot, S., Fonseca, F., Alarcon-Lorca, M. D. Rolland, M. Marin, Physical characterization of formulations for the development of two stable freeze-dried proteins during both dried and liquid storage, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 60 (2005) 335–348.

Pinto, A. F. M., Dobrovolski, R. Veiga., A. B. G., Guimarães, J. A.. Lonofibrase, a novel a-fibrinogenase from *Lonomia obliqua caterpillars*. *Thrombosis Research* (2004) 113, 147–154.

Rai, S. K., Ashis K. Mukherjee. Ecological significance and some biotechnological application of an organic solvent stable alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* strain DM-04. *Bioresource Technology* 100 (2009) 2642–2645.

Richardson, M., Sanchez, E., 2006. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. *Biochimie* 88, 189–200.

Wang , S., Deng, Z. QiLi , Xin Ge , Qiqing Bo , J Liu, J., Cui, J., Jiang, X., Liu, J. Lianzhi Zhang , Min Hong. A novel alkaline serine protease with fibrinolytic activity from the polychaete, *Neanthes japonica*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 159 (2011) 18–25.

Wang S.L. , Yeh PY 2006 Production of a surfactant-and solvent stable alkaliphilic protease by bioconversion of shrimp shell wastes fermented by *Bacillus subtilis* TKU007. *Process Biochem.* 41 1545–1552.

Wang, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 185 (1999) 129–188.

Wang, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.* 203 (2000) 1–60.

Wei, J.A., Lin, Y.Z., Zhou, J.M., Tsou, C.L. FTIR studies of secondary structures of bovine insulin and its derivatives, *Biochim. Biophys. Acta* 1080 (1991) 29–33.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível produzir e escalonar a produção de proteases produzida por *Aspergillus tamaris* UCP 1279 através de planejamentos fatoriais do meio de cultura e condições de crescimento. A integração do sistema de duas fases (PEG 400/Citrato) associado a métodos cromatográficos (troca iônica e gel filtração) permitiram extrair e purificar uma protease de *Aspergillus tamaris* UCP1279. As características bioquímicas da enzima apresentam-se relevante para uma futura aplicação na área industrial. A protease fibrinolítica estudada apresentou resultados relevantes para possíveis aplicações terapêuticas.


**Biomedical
Chromatography**



[Explore this journal >](#)

RESEARCH ARTICLE

Collagenase produced from *Aspergillus* sp. (UCP 1276) using chicken feather industrial residue

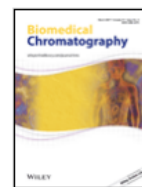
Catarina Michelle Oliveira Ferreira, Patyanne Carvalho Correia, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa , Wendell Wagner Campos Albuquerque, Tatiana Pereira Shin Lin Liu, Galba Maria Campos-Takaki, Ana Lúcia Figueiredo Porto

First published: 19 December 2016 [Full publication history](#)

DOI: 10.1002/bmc.3882 [View/save citation](#)

Cited by: 0 articles  [Citation tools](#)

Early View



[Browse Early View Articles](#)
Online Version of Record
published before inclusion
in an issue