

CAROLINA DA SILVA CANIELLES CAPRARA

PROCESSO DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES
EXTRACELULARES EXPRESSAS POR *PENICILLIUM RESTRICTUM*

BRASÍLIA, 2015

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CAROLINA DA SILVA CANIELLES CAPRARA

PROCESSO DE OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASES
EXTRACELULARES EXPRESSAS POR *PENICILLIUM RESTRICTUM*

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde
pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa Dra Pérola de Oliveira Magalhães

BRASÍLIA
2015

AGRADECIMENTOS

À Deus por sempre me proteger, fortalecer e me mostrar o caminho certo a seguir.

A minha orientadora Professora Dr^a Pérola de Oliveira Magalhães pela oportunidade, ensinamentos, amizade e dedicação e também pelo apoio e compreensão nas horas mais difíceis e delicadas. Meu muito obrigada por tudo.

Aos meus pais por sempre terem me permitido sonhar e acreditar em um futuro melhor. Por serem meus maiores exemplos.

Ao meu grande amigo e companheiro de vida, meu marido Vinícius, que sempre apoia e incentiva todas minhas decisões. Obrigada por sempre estar do meu lado, te amo.

Ao meu pequeno Felipe, pela paz interior, carinho, sorrisos e tudo de bom que trouxestes para a minha vida.

Às professoras Dr^a Yris Maria Fonseca Bazzo, Dr^a Fatima Borin e a Dr^a Paula Souza por participarem da minha banca.

Aos colegas, funcionários e professores do Laboratório de Produtos Naturais agradeço a ajuda, amizade e os momentos de descontração.

A CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado

A FAPDF pelo auxílio financeiro concedido através do processo 193.000.484/2011

Ao MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/ pelo auxílio financeiro através da Rede PRO-CENTRO-OESTE, processo CNPQ 564208/2010-8.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Proteases constituem um dos grupos de enzimas industriais mais importantes, com participação na indústria de detergentes, couro, alimentos e medicamentos. A indústria de detergentes é uma grande consumidora de enzimas hidrolíticas. Novas metodologias que possibilitem a purificação de biomoléculas são de grande interesse para a indústria pelas suas potenciais aplicações. O objetivo principal deste trabalho foi produzir, purificar e caracterizar proteases extracelulares de *Penicillium restrictum* cultivado sob fermentação submersa. A cepa de *Penicillium restrictum* isolada do solo do Cerrado foi capaz de produzir proteases extracelulares após 7 dias de cultivo a 28°C e 150 rpm em meio contendo farelo de trigo. Após os 7 dias de cultivo o filtrado do meio fermentado foi submetido ao processo de ultrafiltração em membrana de 100 kDa e a fração ultrafiltrada foi adicionada ao SMDFA em diferentes condições, sendo avaliada a purificação através de um planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central. Os resultados mostraram que o SMDFA foi eficaz na partição das proteases presentes na fração < 100 kDa para a fase pobre em micelas, apresentando um coeficiente de partição (k) menor que 1 para todos os sistemas testados. O sistema 3 apresentou 80 de balanço de massas e 138,24% de rendimento. Baseado nos valores de k e nos valores do balanço de massa e do rendimento, o sistema contendo 10% Triton X114, 10% de caldo e separado a 31°C foi escolhido para dar continuidade ao processo de purificação da enzima de interesse. A fração pobre em micelas, foi ultrafiltrada em membrana de 30 kDa e o fator de purificação desta fração foi igual a 10,4. A purificação parcial de duas proteases extracelulares foi confirmada por SDS-PAGE seguido de zimograma. As bandas com atividade proteolítica revelaram pesos moleculares de aproximadamente 19,2 e 30,5 kDa. As proteases parcialmente purificadas apresentaram atividade máxima em pH 8,0 e a temperatura ótima foi estimada em 55°C. A enzima foi levemente inibida por PMSF e bastante inibida pelos íons metálicos Fe e Zn e o íon metálico Mg⁺² induziu um aumento da atividade enzimática. As enzimas parcialmente purificadas foram aplicadas junto a detergentes comerciais apresentando potencial para possível aplicação na indústria de detergentes.

Palavras-chave: Protease, *Penicillium restrictum*, detergentes, enzimas hidrolíticas

ABSTRACT

Proteases are one of the largest groups of industrial enzymes, participating in the detergent industry, leather, food and medicine. The detergent industry is a large consumer of hydrolytic enzymes. New methodologies for the purification of biomolecules are of great interest to the industry for its potential applications. The aim of this work was to produce and purify extracellular proteases from *Penicillium restrictum* under submerged fermentation. The strain of *Penicillium restrictum* isolated from cerrado soil was able to produce extracellular protease after 7 days of cultivation at 28°C and 150 rpm in medium with wheat bran. After 7 days of fermentation, broth culture was submitted to ultrafiltration process through a membrane of 100 kDa. Ultrafiltered fraction was added to SMDFA under different conditions, purification being evaluated through a factorial design 2³ with three replications at center point. The results showed that the SMDFA was effective in partitioning of proteases present in the fraction <100 kDa poor phase micelles, with a partition coefficient (k) less than 1 for all tested systems. The system 3 showed 80 mass balance and 138.24% yield. These results being the best mass balance and the best performance. Based on the k values in the mass balance and income values, the system containing 10% Triton X-114, 10% of broth and separated at 31°C was chosen to continue the process of purification of the enzyme of interest. Micelles poor fraction was ultrafiltered through a membrane of 30 kDa and the purification factor of this fraction was equal to 10.4. The partial purification of two extracellular proteases was confirmed by SDS-PAGE followed by zymography. The proteolytic activity showed bands with molecular weights of approximately 19.2 and 30.5 kDa. The partially purified protease showed maximum activity at pH 8.0 and the optimum temperature was estimated at 55 ° C. The enzyme was slightly inhibited by PMSF and quite inhibited by metal ions Fe and Zn and the metal ion Mg⁺² induced an increased enzyme activity. Partially purified enzymes were applied to commercial detergent Ypê Premium® where the detergent has potential for possible application in the detergent industry aiding the detergent in removing proteinaceous stains.

Keywords: Protease, *Penicillium restrictum*, detergent, hydrolytic enzymes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação esquemática da formação de micelas.....28
- Figura 2 - Organograma do esquema de purificação enzimática utilizado no trabalho**Erro!**
Indicador não definido.
- Figura 3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS–PAGE corado com nitrato de prata. Linha (1) – Marcador de baixo peso molecular (14.4–97.4 kDa, GE-Healthcare), Linha (2) – extrato bruto, Linha (3) – fração < 100 kDa. . **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4 - Curva de coexistência obtida experimentalmente para o SMDFA Triton X-114/tampão acetato de sódio 50 mM.47
- Figura 5 - Ilustração dos SMDFA Triton X-114/ Tampão acetato 50 mM, pH 5 preparados com 10% de Triton X-114, 10% caldo fermentado (Fração < 100 kDa) e mantidos em banho a 31°C por 2 horas.....49
- Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS–PAGE corado com nitrato de prata. Linha (1) – Marcador de baixo peso molecular (14.4–97.0 kDa, LMW Kit, GE-Healthcare), Linha (2) – fração pobre em micelas do SMDFA, Linha (3) – fração < 30 kDa.....52
- Figura 7 – Gel para zimograma contendo gelatina 1% em sua composição para revelar atividade proteolítica. Linha 1: fração < 30 kDa.....52
- Figura 8 - Efeito do pH na enzima protease parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA.....54
- Figura 9 - Efeito da temperatura na enzima protease parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA.....55
- Figura 10 - Determinação da estabilidade da enzima parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA, na temperatura de 55°C e pH 8,0.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características gerais de quatro tipos de proteases	14
Tabela 2 - Valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por <i>Penicillium restrictum</i> . Concentração de Triton X-114, temperatura e concentração de caldo fermentado.	37
Tabela 3 - Composição dos detergentes comerciais utilizados para o teste de efeitos de detergentes comerciais.	43
Tabela 4 – Etapas de purificação das proteases presentes no caldo fermentado. ..	45
Tabela 5 - Resumo do planejamento fatorial 2 ³ com ponto central aplicado na purificação da enzima utilizando SMDFA.	50
Tabela 6 – Etapas de purificação das proteases presentes no caldo fermentado após SMDFA e membrana de 30kDa.	51
Tabela 7 - Efeito de inibidores enzimáticos e íons metálicos sobre as enzimas parcialmente purificadas.....	58
Tabela 8 - Efeito de detergentes iônicos, não iônicos e comerciais nas proteases parcialmente purificadas.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BDA - Ágar Batata Dextrose

BM – Balanço de Massas

Cc – Concentração fase concentrada

Cd – Concentração fase diluída

Ci – Concentração fase inicial

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – MMA - Brasil

CMC – Concentração micelar crítica

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

GRAS – *Generally recognized as safe*

HIV – *Human Immunodeficiency Virus*

k – Coeficiente de partição

LMW – *Low Molecular Weigth*

PEG – Polietilenoglicol

pH – Potencial hidrogeniônico

PMSF – Fenilmetilsulfonilflúor

QSP – Quantidade suficiente para

R – Rendimento

SDFA – Sistema de duas fases aquosas

SDS – Dodecil sulfato de sódio

PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

SMDFA – Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

TCA - Ácido tricloro acético

UV – Ultra violeta

Vc – Volume fase concentrada

Vd – Volume fase diluída

Vi – Volume fase inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1	CERRADO	12
2.2	PROTEASES	13
2.3	PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS	15
2.4	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS	17
2.5	APLICAÇÃO INDUSTRIAL	20
2.5.1	Indústria de detergentes	20
2.5.2	Indústria de Couros	22
2.5.3	Indústria de alimentos	23
2.5.4	Indústria de medicamentos	23
2.6	PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	25
2.6.1	Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas	27
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1	MANUTENÇÃO DAS CEPAS	32
4.2	PREPARAÇÃO DO INÓCULO, PREPARO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	32
4.3	DOSAGEM DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	33
4.4	DOSAGEM DE PROTEÍNA	34
4.5	PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	34
4.5.1	Ultrafiltração	35
4.5.2	Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas	36

4.6	ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE 12%).....	39
4.6.1	Revelação do SDS-PAGE	40
4.7	ZIMOGRAMA.....	40
4.8	CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA	41
4.8.1	Efeito do pH sobre a atividade de protease	41
4.8.2	Efeito da temperatura sobre a atividade de protease	41
4.8.3	Estabilidade térmica das enzimas parcialmente purificadas.....	41
4.8.4	Efeito de inibidores de protease e de íons metálicos na atividade enzimática	42
4.8.5	Efeito de detergentes iônicos, não-iônicos e comerciais	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1	PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO FUNGO <i>PENICILLIUM RESTRICTUM</i>	44
5.2	PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO APLICADOS AS PROTEASES EXTRACELULARES.....	45
5.2.1	Ultrafiltração por membrana	45
5.2.2	Construção da curva de coexistência do SMDFA Triton X-114/Tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0	47
5.2.3	Aplicação do SMDFA Triton X-114/Tampão na purificação de proteases.....	48
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES PRESENTES NA FASE POBRE EM MICELAS DO SMDFA TRITON X-114/TAMPÃO FOSFATO	54
5.3.1	Avaliação do efeito do pH e temperatura sobre as enzimas purificadas	54
5.3.2	Avaliação da estabilidade térmica das enzimas purificadas na fração <30 kDa	56
5.3.3	Efeito de inibidores, íons metálicos, detergentes iônicos, não iônicos e comerciais na atividade enzimática	57
6	CONCLUSÃO	61
7	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A ligação peptídica é a ligação que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas. A hidrólise das ligações peptídicas é fundamental para a determinação da composição dos aminoácidos das proteínas. As proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas (1). Elas são classificadas como peptídeo-hidrolases ou peptidases (EC 3.4) e constituem uma grande família, dividida em endopeptidases (EC 3.4.21- 99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19) (2, 3).

Esse importante grupo de enzimas participa de processos industriais na indústria de detergentes, couros, alimentos, farmacêutica e têxtil devido a sua grande diversidade estrutural e seus mecanismos de ação (3, 4). As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, movimentando cerca de 3 bilhões de dólares ao ano, uma vez que desempenham importante papel na área da biotecnologia e representam cerca de 40% do total das vendas em nível mundial de enzimas (5, 6). A exploração contínua de enzimas e suas utilidades têm expandido seu mercado industrial com o crescimento de 7,6% ao ano (7). As proteases, são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, e são encontradas em uma ampla diversidade de fontes tais como, plantas, animais e microrganismos (2).

Os microrganismos são uma importante fonte de proteases devido à sua ampla diversidade bioquímica e à sua susceptibilidade à manipulação genética, eles são facilmente cultivados em larga escala e proporcionam assim altos rendimentos (8). Em geral, as proteases microbianas são de natureza extracelular, sendo secretadas direto para o caldo de fermentação, diminuindo as etapas para a purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas a partir de plantas e animais, tornando assim o processo mais fácil e rápido e com um menor custo (9).

Proteases de origem fungica apresentam a vantagem de serem cultivadas utilizando meios de cultura de baixo custo, como por exemplo, meios à base de resíduos agrícolas como a soja, o bagaço da cana, o farelo de trigo e o farelo de

arroz (10). Quando se visa à produção dessas enzimas em grande escala, vários resíduos agroindustriais têm sido estudados como substratos, devido à disponibilidade local e também por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial (11).

Na última década ocorreu um significativo avanço em relação ao estudo de sistemas de duas fases aquosas para purificação de proteínas. Porém, pouco se investigou até o presente momento a respeito da utilização destes sistemas para purificação de proteases de origem fungica. Em geral, as técnicas utilizadas para purificação de proteases, são técnicas cromatográficas, de alto custo e não justificam sua aplicação para a indústria de detergentes, uma vez que o grau de pureza necessário para a aplicação é menor que o exigido para medicamentos ou alimentos.

Técnicas de baixo custo, como a extração líquido-líquido em duas fases aquosas, utilizando diferentes fluidos complexos têm sido estudadas e aplicadas à extração de biomoléculas, de forma a propiciar ambiente ameno para as biomoléculas. Dentre os diferentes sistemas de extração líquido-líquido, o Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA), constituído primariamente por soluções de tensoativos contendo micelas, oferece simultaneamente ambiente hidrofóbico e hidrofílico, permitindo seletividade na partição de acordo com a hidrofobicidade das biomoléculas e dos contaminantes (12, 13).

Desta forma, um estudo detalhado da aplicação de sistemas micelares para purificação de proteases, incluindo construção de diagramas de fases, verificação das forças dominantes na partição das enzimas e capacidade de remoção, consiste em contribuição de suma importância científica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CERRADO

O Cerrado está localizado na região central do Brasil e compreende os Estados do Pará, Piauí, Maranhão, Bahia, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Minas Gerais e Distrito Federal (14). É considerado o segundo maior bioma brasileiro, ocupando 23% do território nacional, abrangendo cerca de 2 milhões de km² do Brasil Central (15, 16).

O Bioma Cerrado tem sido identificado como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (17, 18). Estima-se que existem 160.000 espécies de plantas, animais e fungos presentes no bioma Cerrado (19). Suas altas temperaturas ao longo do ano e o clima seco resulta em uma vegetação rasteira com árvores escassas (15). Foram relatados nessa área solos superficiais férricos, argilosos e arenosos (15, 20).

O Cerrado é considerado como detentor de uma grande biodiversidade de microrganismos vivos, mas pouco se sabe sobre o potencial biotecnológico dos fungos do seu solo (15). Estes solos podem constituir uma excelente fonte para a descoberta de novas enzimas, incluindo proteases, que são de valor comercial considerável para o uso em alimentos, indústrias farmacêuticas e detergentes (21). Artigos sobre microrganismos isolados desta área, incluem espécies produtoras de protease e amilases (15). Como diversos nutrientes estão disponíveis, as plantas do cerrado são um excelente habitat para bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Estima-se que pelo menos 24 mil espécies de fungos filamentosos estão associadas as plantas do cerrado (22, 23).

2.2 PROTEASES

As proteases fazem parte de uma classe de enzimas que ocupa uma importante posição em relação as suas aplicações nos campos comercial e fisiológico, e constituem a maior família de enzimas, compondo uma estimativa de 2% do genoma humano (2, 24). Elas são encontradas em todos os organismos, onde desempenham um papel essencial em processos metabólicos e fisiológicos (3). Proteases (peptidases ou peptídeo hidrolases) são enzimas proteolíticas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (2, 25). Constituem uma grande família (EC 3.4), dividida em endopeptidases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,1-8,0) e alcalinas (pH 8,1-13,0) (2, 26, 27).

As proteases podem ser subdivididas em dois grupos principais, como exopeptidases e endopeptidases dependendo do seu local de ação. Exopeptidases clivam a ligação peptídica próxima ao C ou N terminal do substrato. Com base no seu local de ação, as exopeptidases são classificadas como aminopeptidases e carboxipeptidases. Enquanto que as endopeptidases clivam as ligações peptídicas distantes dos terminais do substrato. A presença do grupo amina ou carboxila livre possui uma influência negativa sobre a atividade da enzima. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos com base no seu mecanismo catalítico em, serina proteases, aspártico proteases, cisteíno proteases e metalo proteases (2).

De acordo com o grupo funcional presente no sítio ativo, as proteases podem ser classificadas em quatro proeminentes grupos em, serina, aspártica, cisteína e metalo proteases. A Tabela 1 apresenta as características das quatro classes de proteases.

Tabela 1 - Características gerais de quatro tipos de proteases

Tipo de protease	Aspártico	Cisteína	Metalo	Serina
EC No	3.4.23	3.4.22	3.4.24	3.4.21
Peso Molecular	30-45	34-35	19-37	18-35
pH ótimo	3-5	2-7	5-7	6-11
Temperatura ótima	40-55	40-45	65-85	50-70
Resíduo do sítio ativo	Ácido Aspártico	Aspartato ou cisteína	Fenilalanina ou Leucina	Serina, histidina e aspartato
Principais inibidores	Pepstatina	Iodoacetamida, p-CMB	Agentes quelantes, como EDTA	Fenilmetilsulfonil fluoreto, EDTA, inibidor de tripsina, tampão fosfato, fenóis, ácido acético triamino
Principais fontes	<i>Aspergillus</i> , <i>Mucor</i> , <i>Endothia</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Neurospora</i> , Tecido animal (estomago)	<i>Aspergillus</i> , casca de abacaxi, papáia, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus</i>	<i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i> , tecido animal (intestino), <i>Tritirachium</i> álbum

Fonte: Vishwanatha (2009) (28).

Como as proteases são de grande relevância para a biotecnologia, em 2007, Barret & Rawlings propuseram uma nova forma de classificação para distinguir uma protease da outra, agrupando as enzimas de acordo com sua estrutura química, ou seja, de acordo com a homologia na sequência de aminoácidos. Foi criado o banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk>) que possui como objetivo atender a necessidade de uma fonte integrada de informações sobre proteases. O banco de dados possui classificações hierárquicas, em que conjuntos homólogos de proteases são agrupados em espécies de proteínas, que são agrupadas em famílias que por sua vez são agrupados em clãs. As famílias são identificadas por uma letra maiúscula que representa o tipo de catalisador que a enzima possui, juntamente com um número único. Subfamílias são marcadas com uma segunda letra maiúscula. Baseando-se nestes critérios, as famílias das proteases são

denominadas com as letras S, C, A, M e U para os tipos serina, cisteína, aspártica, metálica e tipo desconhecido, respectivamente (29).

De maneira geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para subsequente absorção pela célula, à medida que as proteases intracelulares possuem um papel significativo na regulação do metabolismo (2).

A relevância deste grupo de enzimas, rica em diversidade estrutural e mecanismos de ação, se reflete na importância da sua aplicação em processos industriais. Proteases são consideradas uma das principais enzimas industriais (30). Podem ser utilizadas em diversos ramos da indústria, como o de alimentos, de detergentes, de couros e de medicamentos (31, 32). Sendo assim, a procura industrial de enzimas proteolíticas, com adequada especificidade e estabilidade ao pH, a temperatura, e agentes químicos, continua a motivar a busca de novas fontes (7).

2.3 PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS

As proteases são fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, sendo encontradas em várias fontes como plantas, animais e microrganismos (2, 33). O interesse na produção de proteases a partir de microrganismos existe pelo fato de a produção de proteases de origem animal e vegetal não atender a demanda mundial de enzimas (26). Proteases de origem microbiana estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e tem sido muito estudadas. (34). Representam cerca de 40% das proteases vendidas no mundo todo (35, 36).

Proteases de origem microbiana são classificadas como ácidas, neutras ou alcalinas, ativas em uma ampla faixa de pH de 4,0 a 11,0 e que atuam em ampla variedade de substrato. Enquanto que a maioria das proteases dos microrganismos isolados do solo se apresentam na faixa de pH igual a 8,0 e 9,0 com a temperatura entre 40-60°C (37).

Embora, as proteases possam ser encontradas na natureza de forma difundida, microrganismos servem como fonte preferida destas enzimas pela necessidade de espaço limitado para o cultivo, crescimento rápido e facilidade com que podem ser geneticamente manipuladas para produzirem novas enzimas que são desejáveis para diferentes aplicações (7). Em geral, a maior parte das proteases microbianas, são extracelulares e são diretamente secretadas no caldo de fermentação pelo microrganismo, o que facilita o processo de recuperação e purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas a partir de plantas e animais (25).

No entanto, as proteases de origem fungica apresentam muitas vantagens em relação às proteases de origem bacteriana, dentre as quais, os fungos apresentam a capacidade de crescer em ambientes sob as mais variadas condições, como, temperatura, pH e variação de nutrientes do meio (38, 39). Além de apresentarem uma maior facilidade de remoção do micélio do meio após o cultivo (40). Esta característica influencia diretamente o processo de purificação enzimática (7).

Porém, em comparação a estudos sobre proteases bacterianas, as proteases de origem fungica, possuem estudos limitados, principalmente sobre espécies que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Conidiobolus*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus* (41, 42). Estes gêneros são os mais utilizados para a produção de protease uma vez que várias espécies destes gêneros são consideradas espécies seguras (*Generally recognized as safe - GRAS*) (7).

A literatura relata que espécies de fungos do gênero *Penicillium* possuem um grande potencial para a produção biotecnológica de proteases e outras enzimas. Choabouni e colaboradores (1995) produziram celulase a partir de *P. occitanis* (43). Um estudo conduzido por Mikhailova e colaboradores (1994) investigou a produção de pectinase a partir de três fungos *P. janthinelum*, *P. citrinum* e *P. adametzii* (44). Hashimoto e colaboradores (1972) relataram a produção de altos níveis de protease a partir de *P. duponti* (45). Zhu e colaboradores (2009) purificaram uma serina protease a partir do fungo *Penicillium chrysogenum* FS010 (46). Outro exemplo foi o estudo realizado por Hajji e colaboradores (2007) que produziram, purificaram e caracterizaram uma protease alcalina através do fungo *Aspergillus clavatus* ES1

(47). Agrawal e colaboradores (2004) relataram a produção de uma protease alcalina por um isolado de *Penicillium sp.* (48). *Penicillium charlesii* e *Penicillium griesofulvin* são conhecidos por produzir proteases alcalinas sob condições em estado submerso e sólido respectivamente. A produção de outras proteases alcalinas também são relatadas pelos gêneros *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Beauveria* (48).

As proteases de origem microbiana apresentam vantagens como especificidade a diferentes substratos. Justifica-se assim, o presente trabalho, aprofundar o estudo de proteases de origem microbiana que é de grande valia nas áreas bioquímicas e biotecnológicas, como nas indústrias de detergentes, têxteis, alimentícias e de medicamentos.

2.4 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Os resíduos vegetais constituem o mais abundante recurso natural renovável do planeta. Desta forma, vários processos estão sendo desenvolvidos utilizando resíduos agroindustriais como matéria-prima para a produção de produtos químicos e produtos finos de valor agregado como o etanol e enzimas.

Além disso, a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos fornece um substrato alternativo e também ajuda a resolver problemas de poluição que a sua disposição pode causar (49, 50). Em geral, a preocupação em relação à utilização mais eficiente de resíduos agroindustriais vem aumentando a cada ano (50). E isso acontece, principalmente com o objetivo de reduzir custos com o descarte desses resíduos no meio ambiente (51). Vale lembrar que, o aumento da expansão das atividades agroindustriais levou ao acúmulo de uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos como, por exemplo, de madeira (árvores), herbáceo (grama), agrícola (por exemplo, milho, e palha de trigo), silvicultura (serragem), resíduos sólidos (papel) e resíduos diversos, o que gera custos para o descarte ou problemas ambientais que precisam ser resolvidos (52).

No Brasil, a cana é uma das maiores culturas agrícolas, fornecendo uma enorme quantidade de resíduos. Devido ao seu baixo teor de cinzas, o bagaço oferece inúmeras vantagens, em comparação com outros resíduos de culturas, tais como palha de arroz e palha de trigo, para uso em processos de bioconversão (53). No entanto, ela possui um valor baixo de nutrientes. A soja e o farelo de trigo são boas fontes de nitrogênio e têm sido usados em misturas com o bagaço de cana para a produção de celulases (54). Cascas de frutas cítricas são os principais subprodutos da indústria de transformação de citrinos e conta com cerca de 50% do peso da fruta fresca (55). O que também representa um resíduo abundante no Brasil e vem sendo usado em misturas com o bagaço de cana na produção de celulases (54).

Resíduos agroindustriais contêm material lignocelulósico disponível para exploração como fontes de matérias-primas químicas, combustíveis e alimentos. Os resíduos agroindustriais representam uma importante fonte alternativa para o crescimento microbiano e produção de enzimas industriais (56).

Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases esteja relacionado ao meio de cultivo utilizado para o crescimento do microrganismo (11). Os resíduos agrícolas são um substrato ótimo e promissor para a produção de proteases além de também serem bastante disponíveis (57). Visando à produção em escala industrial, subprodutos são uma interessante alternativa econômica, tornando o processo mais barato (58).

Na literatura, diferentes resíduos agroindustriais têm sido utilizados para produção de protease e amilase sob fermentação em estado sólido e submerso, como farelo de trigo, farelo de soja, farelo de arroz, milho, farelo de lentilha, casca de laranja, casca de banana e casca de maçã (59, 60). Estes resíduos são fontes complexas de carbono e nitrogênio influenciando diretamente na produção de proteases pelos microrganismos.

Vários estudos foram realizados recentemente para caracterizar diferentes proteases a partir de microrganismos, incluindo fungos, tais como *Microsporium* e *Alternaria*, e bactérias, tais como *Bacillus* e *Pseudomonas*. De fato, a produção de

proteases por microrganismos é bastante influenciada por componentes do meio, especialmente fontes de carbono e de nitrogênio, e por fatores físicos, como temperatura, pH, tempo de incubação, a agitação, e a densidade do inóculo (61).

Trabalhos apresentaram que a expressão e secreção de diferentes conjuntos de proteases e outras enzimas, bem como as suas propriedades bioquímicas, podem ser reguladas pelo tipo de substrato usado como fonte de carbono e nitrogênio (60, 62, 63). A produção de proteases extracelulares é influenciada pela disponibilidade de fontes de carbono e de nitrogênio do meio, e ambos os parâmetros exercem efeitos reguladores sobre a síntese da enzima (64). Proteases produzidas por microrganismos são influenciadas pela qualidade da fonte de nitrogênio. Normalmente, os fungos produzem enzimas proteolíticas em fontes nitrogenadas proteicas mais complexas do que em fontes de nitrogênio inorgânico ou de baixo peso molecular (65, 66).

Um estudo utilizou uma torta de soja como fonte de carbono e nitrogênio para caracterização de uma serino protease neutra produzida pelo fungo *Penicillium sp.* em fermentação em estado sólido (67). Farelo de girassol foi utilizado como fonte de carbono e nitrogênio e apresentou influência sobre proteases expressas por *A. niger* sob fermentação em estado submerso (68). Castro e colaboradores (2014) relataram a produção de proteases por *Aspergillus niger* LBA02 usando farelo de trigo, farelo de soja e farelo de algodão como substrato em fermentação em estado submerso onde o farelo de trigo apresentou a principal razão entre carbono e nitrogênio (60). Um trabalho realizado por Yang e colaboradores (1999), relatou a produção de proteases através de resíduo de batata doce e de casca de amendoim em estado submerso através de *Streptomyces rimosus* (69). Outro estudo relatado por Sandhya e colaboradores (2005) verificou a produção de proteases usando diferentes resíduos agroindustriais em fermentação em estado submerso através de cepas dos fungos *Aspergillus oryzae* e *Penicillium sp.*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium phinophilum*, *Penicillium aculeatum* (35). Ladeira e colaboradores (2010) otimizaram a produção de proteases sob fermentação submersa, utilizando como substratos a pectina de maçã, proteínas do soro de queijo e água de maceração do milho através de cepas de *Bacillus sp-2* (70).

Resíduos de penas, um subproduto resultante do processamento industrial de penas de aves, constitui o material rico em queratina mais abundante na natureza. A queratina no seu estado nativo não é degradável por enzimas proteolíticas comuns como tripsina, pepsina e papaína (71). Diversas bactérias do gênero *Bacillus*, cultivadas em meio contendo penas ou farinha de penas produzem proteases queratinolíticas (58). Um estudo relatou a purificação e a caracterização de uma queratinase secretada por *Aspergillus oryzae* isolado a partir de penas degradadas (72).

2.5 APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As proteases são as mais importantes enzimas industriais sendo utilizadas em processos industriais como indústria de detergentes, couros e alimentos (7). O uso de proteases nos setores alimentício e na indústria de detergentes são os mais descritos na literatura (2).

A importância deste grupo de enzimas, rica em diversidade estrutural e mecanismos de ação se reflete no valor de suas aplicações em processos industriais. Conseqüentemente, a procura industrial de enzimas proteolíticas, com adequada especificidade e estabilidade ao pH, a temperatura, e agentes químicos, continua a motivar a busca por novas fontes (4, 7).

Os fungos filamentosos possuem um papel crescente na obtenção e produção em larga escala de enzimas com diversas aplicações que se estendem desde alimentação humana e animal até a indústria de detergentes (73).

2.5.1 Indústria de detergentes

Nas indústrias de detergentes o uso de enzimas como aditivos é muito representativo, correspondendo aproximadamente 25% do total das vendas mundiais de enzimas (74). As proteases são muito empregadas nessa categoria

como aditivos, pois possuem a função de remover manchas e resíduos proteicos derivados de sangue, carne, leite, ovo além de serem biodegradáveis, aumentarem o desempenho e reduzirem o custo do processo (74, 75).

Enzimas tem a finalidade de retirar manchas difíceis quando utilizadas nas formulações detergentes. Hoje, muitos produtos detergentes de lavanderia contêm conjuntos de enzimas incluindo proteases, amilases, celulases e lipases (76). Vários fatores como pH, temperatura da solução de lavagem e composição do detergente influenciam no desempenho da protease alcalina em detergente. O ideal é que as proteases utilizadas em formulações de detergentes possuam elevada atividade e estabilidade dentro de uma ampla faixa de pH e temperatura, e também devem ser compatíveis com os vários componentes do detergente, juntamente com agentes oxidantes e sequestrantes além de serem efetivas em baixas concentrações (0,4 - 0,8%) (11, 25, 75).

A presença de enzimas proteolíticas alcalinas em formulações de detergentes amplia o potencial de limpeza consideravelmente entre 30 e 40% (77). O uso dessas enzimas favorece também a conservação das fibras dos tecidos e o seu caráter biodegradável (74).

Queratinases possuem a capacidade de se ligar e hidrolisar substratos sólidos, sendo esta, uma propriedade importante das enzimas para uso em detergentes. Considerando que, os detergentes atuam em substratos proteicos presentes em superfícies sólidas, o que o torna um atraente aditivo para produtos de limpeza de superfície dura. Estas enzimas também podem atuar na remoção de sujidades queratínicas, como em colarinhos de camisas (78, 79). Outra aplicação em detergentes seria na utilização como aditivo para limpeza de drenos entupidos com resíduos queratinosos (72, 79).

Além disso, proteases alcalinas são utilizadas para auxiliar a remoção de resíduos de indústrias de processamento de alimentos e também em atividades domésticas (34). Um estudo investigou a eficiência de proteases produzidas a partir de *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum*. O objetivo do estudo foi o uso da protease fungica para reduzir o uso de produtos químicos utilizados em detergentes

ajudando assim a eliminar a toxicidade do efluente da empresa (25). Um estudo realizado por Phadatare e colaboradores (1993) relatou a produção de uma protease alcalina produzida a partir do fungo *Conidiobolus coronatus* em cultura submersa e sua posterior aplicação em detergentes onde ela apresentou ser útil para utilização em detergentes em pó (81). Um outro estudo realizado por Moreira e colaboradores (2002) estudou a aplicação de protease para aplicação como aditivo em detergentes para roupas obtida a partir de *Nocardioopsis sp.* e apresentou bons resultados (77). Estudo realizado por Rai e Mukherjee (2011) isolou a partir de *Bacillus subtilis* uma protease que apresentou ser compatível com a formulação de detergente e um possível potencial para a aplicação na indústria de detergentes (32). Rao e colaboradores (2009) relataram a aplicação da protease alcalina obtida a partir de *Bacillus circulans* na indústria de detergentes para retirar manchas proteicas (82). Proteases alcalinas de *Bacillus brevis* (83), *Bacillus sp SSR1* (84) tem sido utilizadas na formulação de detergentes. A primeira vez em que foi relatado o uso de proteases em detergentes foi em 1913 e consistia em carbonato de sódio e extrato de pâncreas (2). Proteases microbianas foram relatadas e utilizadas somente a partir de 1956 (80).

2.5.2 Indústria de Couros

As proteases também são utilizadas para auxiliar a depilação de pelos na indústria de couros. Proteases alcalinas podem substituir produtos químicos como sulfeto de sódio que são considerados prejudiciais tanto para a saúde quanto para o meio ambiente. Elas auxiliam na quebra seletiva de tecido queratina no folículo, puxando assim, para fora os pelos intactos, sem afetar a resistência à tração de couro (79, 85). A utilização de enzimas além de melhorar a qualidade do couro previne problemas com poluição (2, 86).

Uma protease alcalina isolada do *Thermoactinomyces sp.* apresentou um excelente efeito no tratamento de couro de animais, sem qualquer efeito adverso

sobre a pele, e ainda recuperando os pelos que podem ser utilizados para outros fins (87, 88). Alguns estudos utilizaram proteases produzidas por *Bacillus subtilis* (85), *Bacillus pumilus* (89) e *Aspergillus tamarii* (90) e obtiveram resultados satisfatórios para uma depilação efetiva sem causar danos à qualidade das peles.

2.5.3 Indústria de alimentos

Na indústria alimentícia as proteases são usadas em laticínios, massas, fabricação de pães, fabricação e clarificação de cerveja e hidrolisados proteicos. Proteases também exercem papel no amaciamento de carnes, com a função de hidrolisar proteínas do tecido conjuntivo e das fibras musculares (75).

Nos processos de panificação a adição de proteases diminui o tempo de mistura e resulta em pães com um volume maior (2). Rao e colaboradores relataram que proteases de *Aspergillus oryzae* têm sido utilizadas na hidrólise limitada das proteínas insolúveis (glúten) da farinha de trigo, garantindo melhor solubilidade e redução no tempo de preparo da massa do pão (2). Proteases de origem fungica e bacteriana são utilizadas na fabricação de "crackers", elas conferem força ideal para a massa e assim resultam em um produto de melhor qualidade (91).

Uma das principais atuações na indústria de alimentos é na área de laticínios, na produção de queijos a partir da coagulação do leite, e na produção de formulações infantis (2).

2.5.4 Indústria de medicamentos

A aplicação de proteases na indústria farmacêutica cresce a cada ano, em função de novas pesquisas de aplicações e do descobrimento de novas fontes produtoras. Dentre as proteases utilizadas podemos destacar as collagenases, queratinases e elastases (88). Elas são utilizadas em formulações como auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. No entanto,

essas proteases são produzidas em pequenas quantidades e requerem alto grau de pureza (2). Uma aplicação de proteases queratinolíticas é na remoção de queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses causadas por fungos dermatófitos (26, 79). Colagenases agem sobre fibras de colágeno podendo gerar peptídeos que apresentam muitas atividades biológicas de interesse industrial sendo aplicados em várias áreas, normalmente para agentes imunoterapêuticos (92). Elas também são bastante utilizadas em práticas médicas como remoção de manchas e queloides, tratamentos de queimaduras e úlceras (88, 93).

Uma protease alcalina produzida por *Aspergillus niger* LCF9 apresenta uma alta atividade colagenolítica, sendo ela utilizada para obtenção de peptídeos de baixa massa molecular de potencial terapêutico (75). Extraída do *Bacillus subtilis* 316M, uma protease que apresenta alta atividade elastolítica foi imobilizada sobre bandagem para aplicações terapêuticas no tratamento de edemas, furúnculos, abscessos profundos e queimaduras purulentas (75).

Proteases possuem a função de hidrolisar ligações peptídicas de queratina, colágeno e elastina da pele em produtos cosméticos. A ação destas proteases está relacionada com a renovação celular, exercendo atividade queratinolítica, promovendo a remoção das células mortas da epiderme e restauração da mesma (94).

Outras possíveis funções na indústria farmacêutica são na atuação nos tratamentos antitumorais, onde as proteases poderiam atuar na modulação de interações do tumor na mama e na próstata diminuindo a progressão do câncer e na alteração óssea que estabelecem metástases (95). Um estudo realizado por Hamilton e colaboradores (2009) relatou o possível uso de proteases em antiplaquetários, onde atuariam como receptores plaquetários de trombina diminuindo o risco de trombose (96).

2.6 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

Purificação enzimática é um processo complexo que elimina constituintes indesejáveis do meio de cultivo como, por exemplo, moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultivo e outros metabólitos extracelulares que não a proteína de interesse (97). Sendo assim, a proteína de interesse é isolada do meio e suas características específicas podem ser determinadas.

Muitos métodos têm sido utilizados para a recuperação e purificação de proteínas e enzimas de origem animal, vegetal ou microbiana (98). Estes métodos envolvem precipitação por sulfato de amônio, exclusão por tamanho, cromatografia de troca iônica, por afinidade utilizando metais como ligantes, sistemas de duas fases aquosas, entre outros métodos (99).

Para as purificações enzimáticas não existe um protocolo definido, pois os cultivos enzimáticos não são sempre iguais, nem o tipo de fermentação, nem o meio de cultivo, nem o microrganismo utilizado na produção. Para isso é importante o desenvolvimento de um protocolo específico, que normalmente envolve algumas etapas como: clarificação da amostra (filtração e/ou centrifugação) para obter o extrato bruto enzimático, concentração da amostra (ultrafiltração ou precipitação por sais ou solventes orgânicos), e por fim, ocorre a purificação em alta resolução (técnicas cromatográficas) (97). Em todo o processo existem muitas dificuldades do ponto de vista técnico, além de exigir um elevado número de etapas (98).

Quando se inicia um processo de purificação enzimática devemos saber qual o grau de pureza que queremos obter. Enzimas para fim terapêutico ou de uso direto necessitam de um grau de pureza alto, já as enzimas aplicadas em outros processos industriais mais simples como detergentes não é necessário um grau de pureza tão alto (100).

Uma técnica importante para a purificação enzimática, que podem ser separadas de acordo com o seu tamanho, carga, hidrofobicidade e afinidade bioespecífica é a extração líquido-líquido através de Sistema de Duas Fases Aquosas. A extração líquido-líquido é um processo de transferência de um soluto de

uma fase líquida para outra fase líquida imiscível em contato com a primeira. Entre os diferentes tipos de sistemas de extração líquido-líquido destaca-se o Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA), constituído primeiramente por moléculas de tensoativos que tendem a formar micelas (13).

Esta forma de extração, normalmente é adequada para as primeiras etapas dos processos de separação, mas pode também substituir etapas cromatográficas dependendo do tipo de aplicação do produto purificado (101).

Os Sistemas de Duas Fases Aquosas (SDFA) vem se tornando um importante instrumento de separação e purificação de uma grande variedade de biomoléculas, inclusive de células derivadas de plantas e animais, microrganismos, fungos e os seus esporos, vírus, cloroplastos, mitocôndrias, proteína e ácidos nucleicos. O processo de separação depende de vários fatores como o tipo de polímero utilizado, sua massa molar, a composição iônica e as características da substância a ser extraída (102-104).

Na literatura podemos encontrar muitos relatos de diversas técnicas utilizadas para purificação de proteases de origem fungica e bacteriana. Papagianni e colaboradores (2014), relatam uma protease produzida por *P. nalgiovense* e purificada por técnicas como precipitação por sulfato de amônio, diálise e ultrafiltração com um aumento de 12,1 vezes da atividade específica (73).

Outro estudo produziu uma protease a partir de *Penicillium chrysogenum* e o processo de purificação envolveu, precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica, e cromatografia de filtração em gel (46).

Uma protease produzida por *Bacillus megaterium* também foi purificada através das técnicas de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e cromatografia de filtração em gel e resultou em duas frações de protease (105). Estudo realizado por Barros e colaboradores (2014) apresentou resultados para purificação de protease expressa por *Penicillium restrictum* utilizando um sistema de duas fases aquosas PEG/NAPA/NaCl com fator de purificação de 1,98 vezes para o melhor sistema (104).

2.6.1 Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

O SMDFA é constituído por moléculas de tensoativos que tendem a formar micelas. Oferecendo simultaneamente um ambiente hidrofóbico e outro ambiente hidrofílico, permitindo a seletividade na partição de biomoléculas. Na composição destes sistemas, são empregados tensoativos adicionados a soluções aquosas, formando duas fases imiscíveis (106).

Agentes tensoativos são moléculas anfifílicas compostas de uma porção hidrofílica ou polar, comumente denominada "cabeça polar", e uma porção hidrofóbica ou apolar, denominada "cauda apolar". Os tensoativos podem ser classificados em três classes gerais: (a.) iônicos (que possuem cabeça positivamente carregada - catiônicos - ou negativamente carregada - aniônicos), (b.) não - iônicos (possuindo uma cabeça polar capaz de realizar ligações de hidrogênio com a água), e (c.) zwitteriônicos (possuindo uma cabeça caracterizada por um dipolo) (107). São exemplos de tensoativos aniônico (carregado negativamente) o dodecil sulfato de sódio (SDS), de catiônico (carregado positivamente) o brometo de cetiltrimetilamônio (CATB), de não-iônico o polioxietileno p-t-octil fenol (Triton X-114) e de zwitteriônico o dioctanoilfosfatidilcolina (C8-lecitina) (107).

Os agentes tensoativos, dependendo da concentração, podem exibir diversos tipos de comportamento. Em soluções com concentração de tensoativo abaixo da concentração micelar crítica (CMC), específica para cada tensoativo, as moléculas de tensoativo adsorvem na interface ar-água, e as caudas apolares são projetadas em direção à fase ar de forma a minimizar o contato com a água e assim portanto, diminuir a tensão existente na interface ar-água. A maioria dos tensoativos apresentam baixa solubilidade na fase aquosa devido ao caráter hidrofóbico da cauda apolar. Portanto, em soluções onde a concentração do tensoativo é superior a CMC, as moléculas de tensoativo tendem a formar agregados que são conhecidos como micelas. Nas micelas as caudas hidrofóbicas se atraem minimizando o contato com a água e as cabeças hidrofílicas permanecem na superfície externa da micela para maximizar este contato (108, 109).

As micelas são arranjos dinâmicos que estão continuamente e reversivelmente trocando monômeros umas com as outras e são compostas de dezenas de milhares de monômeros de moléculas de agentes tensoativos (110).

A formação de micelas reflete um balanço complexo de várias forças intermoleculares, incluindo interações de van der Waals, eletrostáticas, estéricas, hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio (107, 108). O efeito hidrofóbico associado às caudas apolares resulta a principal força atrativa. A força repulsiva contrária é resultado das interações estéricas (existentes entre as cabeças hidratadas de tensoativos não-iônicos) e eletrostáticas (existente entre as cabeças possuindo cargas idênticas) associadas às cabeças hidrofílicas. O processo de micelização é resultado do balanço entre as forças atrativas e repulsivas (111). A Figura 1, apresenta a representação esquemática da formação de micelas.

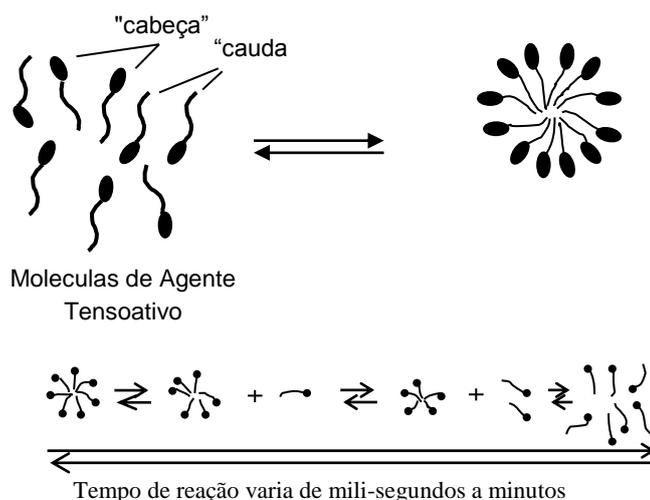


Figura 1: Representação esquemática da formação de micelas. Fonte: Liu et al, 1996. (112).

Micelas, entidades dinâmicas formadas através da agregação não covalente de monômeros de tensoativos, podem ser esféricas, cilíndricas ou planas. Tamanho e forma das micelas podem ser modificados trocando a estrutura química do tensoativo, variando as condições da solução como temperatura, concentração do tensoativo, composição dos tensoativos (no caso de sistemas mistos), força iônica e pH (13, 113).

Uma solução aquosa de tensoativo não-iônico como por exemplo o Triton X-114, é capaz de se separar macroscopicamente em duas fases líquidas aquosas e imiscíveis, com o aumento da temperatura, que resulta em um ambiente concentrado, rico em micelas e outro diluído, pobre em micelas. Como a concentração de tensoativos nas duas fases é superior à CMC, micelas se encontram presentes em ambas as fases porém o grau de polidispersão e o tamanho médio das micelas são diferentes nas duas fases, pois a concentração de tensoativo não é a mesma (114). Uma das fases é chamada de “regime diluído” e a outra “regime semi-diluído” ou “concentrado”. Na primeira as micelas se encontram isoladas umas das outras em solução e na segunda elas formam uma rede onde se encontram enoveladas, é nesta fase que se encontram maiores (mais longas) e mais numerosas. A base de utilização destes sistemas é a distinção que acontece nesse ambiente físico-químico das duas fases formadas (114, 115).

A curva que representa o fenômeno de separação de fases conhecida como “curva binodal” ou “curva de coexistência” que descreve o limite de separação entre a região monofásica e bifásica dos sistemas e apresenta as condições necessárias para se obter a separação das fases. A temperatura em que se inicia a separação em duas fases é conhecida como ponto-de-névoa (*cloud point*). A curva binodal representa o limite, em função da temperatura e da concentração de tensoativo no qual a solução micelar se separa em duas fases macroscópicas (12).

Este método de separação tem sido bastante utilizado na extração e na purificação de inúmeros materiais biológicos como, por exemplo, para proteínas. Vários trabalhos relatam a purificação de diferentes proteínas através de SMDFA com o uso do Triton X-114. Linder e colaboradores (2004) descreveram como eficiente o uso de sistemas micelares para purificação de proteínas (117). Um estudo realizado por Liu e colaboradores (1996) investigaram o uso de sistemas micelares para a separação e concentração de diversas proteínas hidrofílicas incluindo citocromo c, ovoalbumina, albumina de soro bovino onde consideraram os sistemas úteis para concentrar e separação de proteínas (112). Bordier (1981) investigou a partição de proteínas durante a separação de fases em soluções de Triton X-114 (118). Holm e colaboradores (1986) descreveram a separação de fases com uso de Triton X-114 para a purificação de lipase (119).

O SMDFA apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos de purificação de biomoléculas como: ambiente ameno e favorável as biomoléculas, método seguro e de baixo custo, os resíduos gerados são de fácil manuseio, baixa toxicidade, fácil ampliação de escala, possibilita o controle e otimização da partição de biomoléculas e melhoria na seletividade, permite que a análise ocorra por diversas técnicas sem causar interferências (13). Na área de biotecnologia este método tem sido sugerido no lugar ou como processo complementar a cromatografias para reduzir o custo do processo de diversos produtos biológicos (120, 121).

Desta forma torna-se importante um estudo detalhado da aplicação de sistemas micelares para purificação de proteases.

3 OBJETIVOS

Objetivo geral: Obter, purificar e caracterizar pelo menos uma protease expressa pelo fungo filamentoso *Penicillium restrictum*, isolado do solo do Cerrado.

Objetivos específicos:

- Obter proteases extracelulares de *P. restrictum* em meio líquido contendo resíduo agroindustrial;
- Avaliar a interferência do SMDFA na atividade da enzima de interesse;
- Avaliar o comportamento de partição das proteases presentes no caldo fermentado frente a diferentes SMDFA;
- Caracterização das enzimas purificadas quanto ao perfil físico-químico, inibição por metais e íons metálicos;
- Avaliar a atividade da enzima parcialmente purificada junto a detergentes (iônicos, não-iônicos e comerciais).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MANUTENÇÃO DAS CEPAS

A cepa utilizada foi uma cepa do fungo *Penicillium restrictum* isolado do solo do Cerrado Brasileiro pelo grupo do professor Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, coordenador do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília. Esta cepa isolada foi identificada fenotipicamente pelo professor Dr. Luís Roberto Batista do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e encontra-se depositada na Coleção de Microrganismos para Controle de Fitopatógenos e Plantas Daninhas da Embrapa Recursos Genéticos Biotecnologia, credenciada pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético por meio da Deliberação do CGEN No Deliberação nº 67 publicada no D.O.U. em 13.09.2004, Seção 1, página 53, vinculada ao projeto intitulado “Aplicação de Holocelulases de Fungos Filamentosos em Processos Biotecnológicos”, Processo nº 010237/2015-1, Universidade de Brasília.

Os fungos isolados previamente armazenados em glicerol a - 80 °C, foram reativados em placa de Petri contendo ágar batata dextrose 4% (BDA) (Himedia, Mumbai, India) e incubados a 28 ± 2 °C por 7 dias até completo crescimento.

4.2 PREPARAÇÃO DO INÓCULO, PREPARO DO MEIO DE CULTURA E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

O inóculo foi preparado suspendendo o micélio em 5 mL de solução esterilizada composta de 0,9% NaCl e Tween 80 (1mL) (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA).

O preparo do meio mínimo foi feito através da pesagem de todos os componentes do meio, diluídos em água destilada e em seguida adicionado o farelo de trigo, o caldo foi submetido à esterilização em autoclave a 120°C por 20 minutos.

A suspensão foi homogeneizada e uma alíquota foi retirada para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer (10^8 esporos/mL). Esta suspensão micelial (10^8 esporos/mL) foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 250mL contendo 50mL de meio mínimo (0,4% de Extrato de Levedura (Himedia, Mumbai, India); 0,4% de Peptona (Merck, Alemanha); 0,2% de Fosfato de Potássio (Vetec, Brasil); 0,8% de Fosfato de Sódio (Vetec, Brasil) e 0,25% de Sulfato de Magnésio (Vetec, Brasil) acrescido de 1% de farelo de trigo como fonte de carbono. Os cultivos foram incubados em agitador orbital a temperatura de 28°C e 150 rpm e as amostras foram retiradas após 7 dias para determinar a atividade proteolítica. O extrato fungico foi separado da biomassa por filtração a vácuo em funil de Buchner com papel de filtro Whatman nº1 (Millipore, Darmstadt, Alemanha).

4.3 DOSAGEM DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por Charney e Tomarelli (1947) (122), com algumas modificações. A reação foi iniciada por incubação de 250 µL do filtrado a 37°C, na presença de 250 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0. A reação foi interrompida após 40 minutos pela adição de 250 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 6000 rpm por 10 min à 4°C, 500 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 500 µL de KOH 5,0 N. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão) a 430 nm.

O branco da reação foi feito como citado acima substituindo o extrato enzimático por 250 µL de tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0. Este branco foi

utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco da amostra adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min. Os testes foram realizados em triplicata e como controle positivo foi utilizada uma solução de tripsina (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0,001%.

4.4 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas foi determinada como descrito por Bradford (1976) (123). A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mL de amostra a 1 mL do reagente. Após 5 minutos foi feita a leitura a 595 nm. Como curva padrão utilizou-se concentrações de albumina de soro bovino (5- 200 µg/mL).

O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de azul de Comassie G-250 (GE Healthcare, Alemanha) em uma mistura de 100 mL de ácido fosfórico (Synth, Brasil) a 85% e 50 mL de metanol (Synth, Brasil) a 95%. Depois de completa dissolução do corante, adicionou-se água até completar o volume para 1 litro.

4.5 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

O processo de purificação aplicado neste trabalho está apresentado Figura 2. Para a purificação parcial de duas proteases foi necessária aplicação de ultrafiltração utilizando membranas de poros definidos e extração líquido-líquido, utilizando SMDFA.

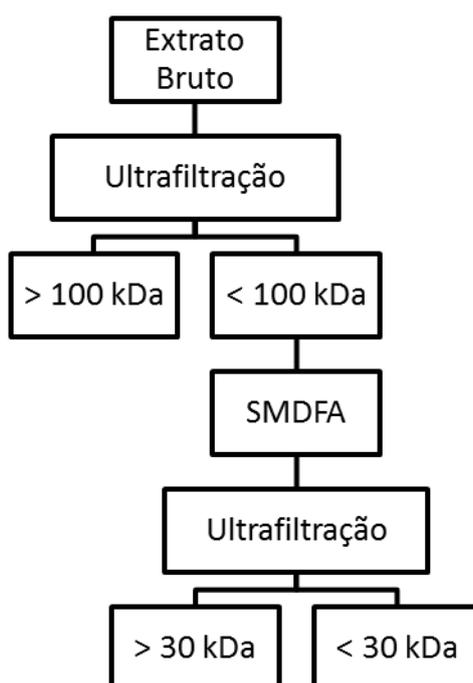


Figura 2 - Organograma do esquema de purificação enzimática utilizado no trabalho.

4.5.1 Ultrafiltração

Para concentração da amostra nas diferentes etapas de purificação foram feitas ultrafiltrações em membranas de poros definidos de 100 e 30 kDa.

O extrato bruto obtido foi concentrado pelo processo de ultrafiltração utilizando uma membrana de poro definido de 100 kDa (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA) pelo sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells. A quantificação de proteína presente no meio foi determinada pelo método de Bradford e a atividade proteolítica determinada como citado no item 4.3.

Após a escolha do melhor SMDFA, foi realizada uma ultrafiltração utilizando uma membrana de poro definido de 30 kDa (Amicon Millipore Co., Bedford, MA, USA) pelo sistema Amicon Filtration System-Stirred Cells. A quantificação de proteína presente no meio foi determinada pelo método de Bradford e a atividade proteolítica determinada como citado no item 4.3.

4.5.2 Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas (SMDFA)

4.5.2.1 Avaliação da Interferência do Triton X-114 na determinação da concentração de protease.

Para avaliar a interferência do Triton X-114 (Sigma-Aldrich, USA) na determinação da concentração de protease os sistemas micelares de duas fases aquosas foram preparados contendo Triton X-114 a 6%, 8% e 10% (m/m) sem adição do caldo fermentado. Os SMDFA foram incubados em banho com temperatura controlada nas temperaturas de 31°C, 35°C e 39°C por 2 horas. A leitura da atividade proteolítica foi realizada como citada no item 4.3 e verificado assim a interferência do tensoativo na atividade de protease. Para eliminação de interferentes na dosagem da atividade proteolítica foi utilizado no lugar do caldo fermentado o tampão acetato de sódio 0,1M pH 5,0.

4.5.2.2 Construção da curva de coexistência para o SMDFA Triton X-114/ tampão acetato de sódio

O mapeamento da curva de coexistência, também conhecida como curva binodal do sistema Triton X-114/ tampão acetato de sódio foi obtida pelo método ponto-de-névoa descrito por Meeren (2002) (124). Soluções compostas com Triton X-114 e tampão acetato de sódio 50mM foram preparadas e colocadas em um banho de temperatura controlada transparente. A temperatura foi inicialmente reduzida, onde a solução apresentou uma fase única e límpida. A temperatura foi aumentada lentamente. A temperatura a qual a solução tornou-se turva, indicando o início da separação de fases, foi determinada como a temperatura de ponto de névoa e uma curva construída correlacionando concentração de Triton X114 nos SMDFA e a temperatura de turvação para cada SMDFA.

4.5.2.3 Ensaio de partição em Sistema Micelar de Duas Fases Aquosas

Os SMDFA foram preparados em tubos graduados de 10mL, pela adição da fração menor que 100kDa nas concentrações de 10, 20 e 30 %, Triton X-114 nas concentrações 6, 8 e 10% e tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0, resultando em sistemas de massa total de 3,0g. Os componentes do sistema micelar foram acrescentados por pesagem, o sistema foi homogeneizado em homogeneizador de tubos, exibindo uma única fase límpida e homogênea. Em seguida o sistema foi transferido para um banho de temperatura controlada com valor previamente ajustado e mantido em repouso por 2 horas para separação de fases e equilíbrio das mesmas. Após o repouso, o volume foi verificado e as amostras das fases superior e inferior foram coletadas cuidadosamente utilizando seringas e agulhas novas. Análises da atividade proteolítica foram realizadas nas amostras das fases. Cada experimento foi realizado em triplicata e os respectivos desvios padrões e intervalos de confiança calculados.

Foi estudada a partição de protease, presentes em caldo fermentado de *Penicillium restrictum* (fração menor que 100 kDa). O estudo da partição foi realizado com três variáveis seguindo um planejamento fatorial 2³ com ponto central e triplicada deste ensaio (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores referentes às variáveis independentes utilizadas na avaliação da partição da protease expressa por *Penicillium restrictum*. Concentração de Triton X-114, temperatura e concentração de caldo fermentado.

Variáveis independentes	Níveis		
	-1	0	-1
Triton X-114% (m/m)	6	8	10
Temperatura °C	31	35	39
Caldo Fermentado% (m/m)	10	20	30

4.5.2.4 Metodologia de Análise dos Resultados

Os resultados obtidos foram analisados inicialmente calculando a razão volumétrica entre as fases formadas no sistema, segundo a equação abaixo:

$$R \equiv \frac{V_c}{V_d}$$

Em que V_c e V_d correspondem aos volumes da fase rica em micelas (concentrada - c) e da fase pobre em micelas (diluída - d), respectivamente.

Logo em seguida foram calculados os coeficientes de partição, k , o qual pode ser expresso por:

$$k \equiv \frac{C_c}{C_d}$$

Em que C_c e C_d correspondem às concentrações da biomolécula na fase rica em micelas (concentrada - c) e na fase pobre em micelas (diluída - d), respectivamente.

Os balanços de massas foram calculados de acordo com a expressão:

$$BM \equiv \frac{C_c V_c + C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\%$$

Em que C_c e C_d e C_i referem-se às concentrações do componente nas fases rica em micelas (c), pobre em micelas (d) e na solução inicial do sistema, respectivamente. V_c , V_d e V_i são os volumes das fases rica em micelas (c), pobre em micelas (d) e da solução inicial do sistema, respectivamente.

Além do coeficiente de partição, a eficiência do sistema em purificar a enzima, também foi avaliada com base no valor de recuperação da enzima protease na fase pobre em micelas em relação à concentração de enzima presente no caldo

fermentado e adicionada inicialmente ao SMDFA, sendo o rendimento R(%), definido a seguir:

$$R(\%) \equiv \frac{C_d V_d}{C_i V_i} \times 100\%$$

4.5.2.5 Estatística

Todos experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos estão apresentados de forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE 12%)

Todos os reagentes para o desenvolvimento das eletroforeses foram adquiridos da GE Healthcare, Alemanha em grau eletroforese.

A eletroforese sob condições desnaturantes foi realizada em gel de poliacrilamida de 12% (p/v) e valores de pH na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) de acordo com técnica descrita por Laemmli (1970) (125). A eletroforese foi realizada em um sistema Mini VE vertical Electrophoresis System/ EPS 301 Power Supply (GE Healthcare, Alemanha), com placas de vidro onde os géis foram montados. As amostras foram previamente submetidas a precipitação com adição de ácido tricloroacético (TCA 75%) e incubadas à 4°C por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos à 4°C. As amostras foram então lavadas com Acetona PA refrigerada e centrifugadas nas mesmas condições por duas vezes. Após a última lavagem, a amostra foi ressuspendida em 10µL de tampão de amostra (Tris-HCl 500mM, pH 7,0; Glicerol, 20%; SDS 4%; β-mercaptoetanol; azul de bromofenol, 0,01%). A solução foi incubada a 100°C por 5 minutos. A cuba para eletroforese foi preenchida com tampão Tris (Tris-HCl 25mM,

glicina 200 mM e SDS 0,075% (p/v), pH 8,3 e refrigerado, em seguida a eletroforese foi realizada.

O marcador de massa molecular *Low Molecular Weight Kit* (LMW) (GE Healthcare, Alemanha) contendo as proteínas fosforilase b (97,0 kDa), soroalbumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), anidrase carbônica (30,0 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa) foi utilizado como referência de migração para determinação das massas moleculares aparentes.

4.6.1 Revelação do SDS-PAGE

Após a corrida eletroforética as bandas proteicas presentes no SDS-PAGE foram reveladas por uma coloração com nitrato de prata. O gel foi incubado por 1 hora em uma solução fixadora (etanol 40% (v/v); ácido acético 10% (v/v)). Logo após o gel foi mantido por 1 hora em uma solução sensibilizante (etanol 30%(v/v); 10 mL de tiosulfato de sódio 5%; 1,25 mL de glutaraldeído 25% e 17g de acetato de sódio qsp 250 mL). Em seguida o gel foi lavado 15 minutos em água destilada por 3 vezes. Após a lavagem o gel foi incubado em uma solução colorante (25 mL nitrato de prata 2,5%; 0,1mL de formaldeído 37% qsp 250 mL) por 15 minutos sob o abrigo da luz. Novamente o gel foi lavado com água destilada e submetido a solução reveladora (6,25g de carbonato de sódio; 0,05 mL de formaldeído qsp 250 mL) até ao aparecimento das bandas. A reação foi interrompida após o surgimento das bandas proteicas por uma solução de parada (3,65g de EDTA qsp 250mL). Todas as soluções foram preparadas no momento do uso.

4.7 ZIMOGRAMA

As amostras foram submetidas a técnica de zimograma através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 1mg/mL de gelatina (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA) que foi copolimerizada ao gel. As amostras foram diluídas no tampão

de amostra sem a adição do agente redutor β -mercaptoetanol e não foram submetidas a desnaturação por calor. Após a corrida o gel foi incubado em uma solução contendo Triton X-100 2% por 1 hora. Em seguida o gel foi incubado em tampão Tris HCl 50 mM contendo ClCa_2 10 mM pH 8 durante 1 hora. Logo em seguida o gel foi fixado com metanol 50% contendo 10% de ácido acético glacial e corado com *Comassie Brilliant Blue R-250* até o aparecimento das bandas.

4.8 CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA PARCIALMENTE PURIFICADA

4.8.1 Efeito do pH sobre a atividade de protease

Para determinar o pH ótimo da enzima presente foi utilizado a solução de azocaseína 0,5% (p/v) dissolvida nos tampões acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0 - 8,0) e tampão tris (pH 9,0 e 10,0). A atividade proteolítica foi avaliada conforme descrito no item 4.3.

4.8.2 Efeito da temperatura sobre a atividade de protease

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinado incubando as amostras em temperaturas variadas de 30 a 65 °C por 40 minutos em pH 8,0. Após o tempo de reação em cada temperatura, a atividade enzimática para proteases foi quantificada conforme descrito no item 4.3.

4.8.3 Estabilidade térmica das enzimas parcialmente purificadas

A estabilidade térmica das enzimas parcialmente purificadas foi determinada na temperatura (55°C) e pH ótimos (8,0 tampão fosfato de sódio) determinados

anteriormente, por períodos de 1, 2, 3, 4, 6 e 15 horas, após cada período de tempo, a atividade proteolítica residual foi quantificada conforme no item 4.3.

4.8.4 Efeito de inibidores de protease e de íons metálicos na atividade enzimática

O efeito de vários inibidores de protease sobre a hidrólise de caseína foi observado para identificar a classe da enzima. Os inibidores utilizados eram específicos para as serino proteases (PMSF), cisteíno proteases (iodocetamida), e metaloproteases (EDTA), todos da marca Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Os íons metálicos em uma concentração de 1 mM (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} e Ag^+) foram adicionados para a determinação dos seus efeitos sobre a atividade da enzima. A enzima foi pré-incubada na presença do inibidor ou de um dos metais durante 30 minutos a 55 °C e a atividade proteolítica foi dosada conforme no item 4.3. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de inibidores metálicos.

4.8.5 Efeito de detergentes iônicos, não-iônicos e comerciais

O efeito de detergentes iônicos e não iônicos sobre a atividade da enzima foi avaliado. Foi utilizado o detergente iônico SDS (dodecil sulfato de sódio), o detergente não-iônico Triton X-100 e o detergente não-iônico Tween 80 a uma concentração final de 1%(v/v). O efeito de detergentes comerciais na atividade de protease foi estudado com a solução de detergentes comerciais tais como, Omo® (Unilever, Brasil), Ypê Premium® (Química Amparo, Brasil) e Brilhante® (Unilever, Brasil), conforme descritos na Tabela 3, a uma concentração final de 1% (v/v).

Tabela 3 - Composição dos detergentes comerciais utilizados para o teste de efeitos de detergentes comerciais.

	Detergente	Composição
A	Omo	Alquil benzeno sulfonato de sódio (tensoativo aniônico), álcool éter sulfato de sódio, alquil polietilado, enzimas, água
B	Ype Premium	Alquil benzeno sulfonato de sódio (tensoativo aniônico) alquil benzeno, sulfonato de trietanolamina, lauril éter sulfato de sódio, água
C	Brilhante	Alquil benzeno sulfonato de sódio (tensoativo aniônico), álcool éter sulfato de sódio, água

A solução com enzima foi pré-incubada com os detergentes a 55°C durante 30 minutos e em seguida ensaiadas para a atividade proteolítica como descrita no item 4.3. A atividade foi expressa como atividade relativa, sendo que 100% de atividade correspondeu à atividade realizada na ausência de detergentes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO FUNGO *PENICILLIUM RESTRICTUM*

Conforme descrito na literatura, espécies de *Penicillium* possuem grande potencial biotecnológico para produção de proteases e outras enzimas. A cepa selecionada para o trabalho foi cultivada em meio mínimo contendo 1% de farelo de trigo. Após 7 dias de cultivo, nas condições apresentadas anteriormente, a atividade proteolítica foi quantificada e um resultado de 52,94 U/mL em pH 5,0, foi obtido. Esta atividade confirma os resultados obtidos anteriormente em trabalhos deste grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dr^a Pérola Magalhães, onde esta cepa expressou proteases extracelulares com atividade em pH 5,0 e 9,0 (146).

No entanto, sabe-se que os valores de atividade proteolítica podem variar por diversos fatores, incluindo a metodologia adotada. Ficando assim mais difícil realizar comparações direta entre diferentes estudos. Kathiresan e colaboradores (2007) relatam que o fungo *Penicillium felutanum* quando cultivado em pH 8,5 apresentou uma atividade de 25 U/mL (126). Um outro estudo relata para a espécie de *Penicillium fellutanum* uma atividade proteolítica de 18,65 U/mL em pH 5,0 (127).

Gombert e colaboradores (1999), descreveram uma atividade proteolítica de 7,8 U/ml para *Penicillium restrictum* quando cultivado em meio sólido contendo torta de babaçu como substrato (128). Para a espécie *Penicillium roqueforti* vários relatos descrevem a produção de uma aspártico-protease extracelular mesmo apresentando uma baixa atividade (0,56 U/mL) (129-131).

Um estudo com o fungo *Penicillium nalgiovense* relatou uma atividade específica de 1,6 U/mg quando foi cultivada em pH 6,5 (73). Aissaoui e colaboradores (2014) descrevem uma atividade de 68,62 U/mL para o fungo *Penicillium digitatum* (7). Um estudo relata a produção de protease pela espécie *Penicillium aurantiogriseum* apresentando atividade específica de 43, 67 U/mg (132).

Considerando que a literatura relata a produção de proteases alcalinas pelo gênero *Penicillium*. O valor da atividade proteolítica obtido no cultivo em meio líquido, após 7 dias de cultivo foi igual a 52,94 U/mL, sendo este resultado comparável com as atividades proteolíticas descritas na literatura. O presente trabalho foi desenvolvido visando a obtenção, purificação desta biomolécula por SMDFA com a posterior caracterização.

5.2 PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO APLICADOS AS PROTEASES EXTRACELULARES

5.2.1 Ultrafiltração por membrana

Após a quantificação da atividade proteolítica, o extrato bruto foi filtrado em sistema de filtração a vácuo utilizando membrana de poro definido de 100 kDa, resultando em uma fração denominada concentrada (> 100 kDa) e outra ultrafiltrada (< 100 kDa). Na fração concentrada o volume foi reduzido 10 vezes, apresentando um aumento na concentração de proteínas, porém não foi observado um aumento no fator de purificação. Os resultados obtidos na ultrafiltração estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Etapas de purificação das proteases presentes no caldo fermentado.

Frações	Proteína Total (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot)	Rendimento (%)	Fator de purificação (vezes)
Bruto	0,344	52,94	153,9	100,0	1,00
> 100 kDa	0,626	35,50	56,7	67,1	0,37
< 100 kDa	0,208	34,05	163,7	64,3	1,06

Como se pode observar na Tabela 4, a fração concentrada (> 100 kDa), apresentou um valor de atividade específica de 56,7 U/mg e um fator de purificação de 0,37 vezes. Na fração ultrafiltrada (< 100 kDa) foi observado o valor de atividade específica de 163,7 U/mg e um fator de purificação de 1,06 vezes onde podemos notar um leve aumento tanto na atividade específica como no fator de purificação em

comparação com o extrato bruto. No entanto, o fator de purificação obtido na fração ultrafiltrada não indica uma purificação para a enzima de interesse. E este resultado pode estar ligado a perda de atividade proteolítica ocorrida durante a ultrafiltração. O perfil proteico foi avaliado por eletroforese e a fração ultrafiltrada revelada possuía um perfil muito semelhante ao extrato bruto o que mostra que o meio não foi clarificado com a ultrafiltração como pode-se observar na Figura 13.

A ultrafiltração, tem sido uma alternativa aos processos convencionais de separação nas indústrias farmacêuticas e biotecnológicas. Dentre as vantagens inclui-se o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas de purificação, maior eficiência e qualidade do produto final, simplicidade de operação e ampliação de escala (97). Esta etapa também pode ser considerada como um processo preliminar (pré-purificação), preparando a amostra para ser aplicada em operações de purificações mais específicas (133).

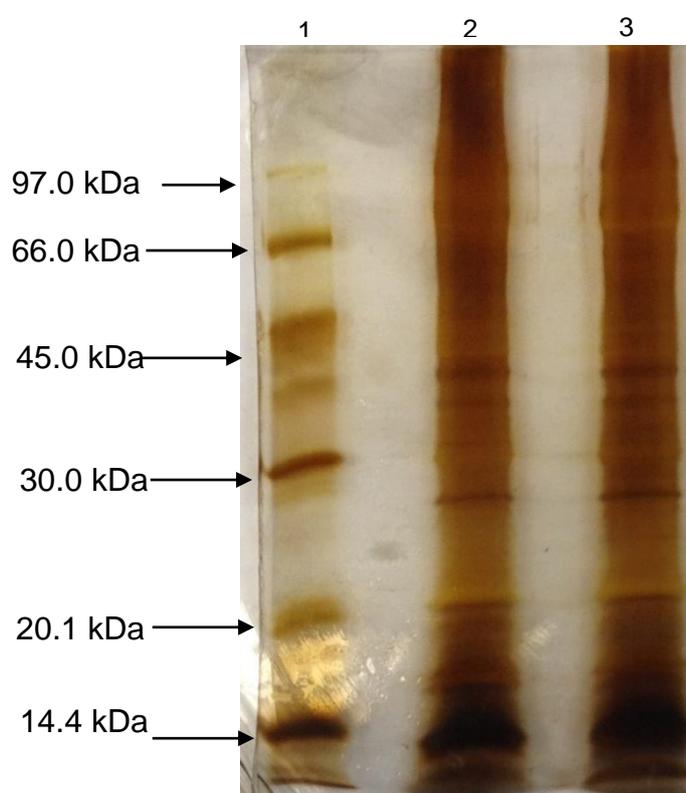


Figura 3 – Eletroforese em gelde poliacrilamida SDS–PAGE corado com nitrato de prata. Linha (1) – Marcador de baixo peso molecular (14.4–97.4 kDa, GE-Healthcare), Linha (2) – extrato bruto, Linha (3) – fração < 100 kDa.

5.2.2 Construção da curva de coexistência do SMDFA Triton X-114/Tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0

Para compreender melhor o comportamento da enzima no SMDFA Triton X114/tampão acetato de sódio 50mM, a curva de coexistência ou binodal foi determinada. A curva de coexistência representa o limite que separa a região de uma fase a partir da região de duas fases de um diagrama de fase apropriado (113). Na Figura 4 a curva de coexistência ou “curva binodal” obtida experimentalmente para o sistema Triton X-114/tampão acetato de sódio 50 mM é apresentada.

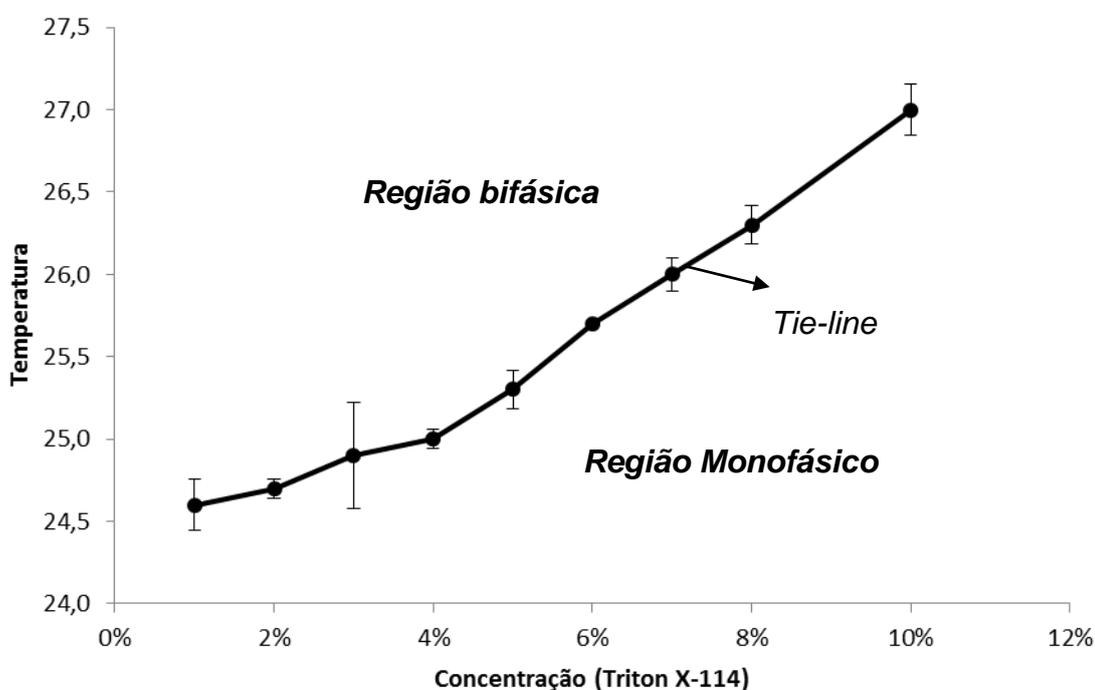


Figura 4 - Curva de coexistência obtida experimentalmente para o SMDFA Triton X-114/tampão acetato de sódio 50 mM.

A curva binodal obtida experimentalmente neste trabalho, está de acordo com as curvas descritas previamente na literatura por Lopes (2006), para o sistema Triton X-114/tampão acetato de sódio. É provável que pequenas diferenças entre as curvas binodais se deva a presença de eletrólitos e impurezas (113). A diferença existente entre os trabalhos também pode ser justificada pelo fato de ter sido utilizado Triton X-114 de diferentes lotes. Além disso, pequenas diferenças existentes entre os banhos termostatizados como espessura do vidro da cuba,

sistema de aquecimento da água e a sensibilidade do medidor de temperatura, podem acarretar pequenas diferenças no ponto de névoa observado pelo pesquisador.

5.2.3 Aplicação do SMDFA Triton X-114/Tampão na purificação de proteases

A partição da enzima protease no SMDFA foi estudada utilizando a fração < 100 kDa, em diferentes temperaturas (31, 35 e 39 °C), concentrações do extrato bruto (10, 20 e 30%) e concentrações de tensoativo (6, 8 e 10%), como descrito nos materiais e métodos. Um planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central foi o escolhido para avaliarmos a melhor condição de purificação da enzima de interesse no SMDFA. Na Figura 5 podemos observar a presença das duas fases dos SMDFA nas seguintes condições avaliadas: SMDFA contendo 3g de massa total, com 10% (m/m) de caldo fermentado e 10% (m/m) de Triton X-114 em tampão acetato de sódio 50 mM.



Figura 5 - Ilustração dos SMDFA Triton X-114/ Tampão acetato 50 mM, pH 5 preparados com 10% de Triton X-114, 10% caldo fermentado (Fração < 100 kDa) e mantidos em banho a 31°C por 2 horas.

Na Tabela 5 estão representados os resultados obtidos nos ensaios realizados com o SMDFA Triton X-114/tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. O valor do coeficiente de partição para proteases (k), em todos os ensaios foi inferior a 1, pois a enzima de interesse, particionou preferencialmente para a fase pobre em micelas, sugerindo um caráter hidrofílico para as proteases presentes no caldo fermentado. Os ensaios 9,10 e 11 foram os que apresentaram os menores valores de k , no entanto o ensaio 3 apresentou um balanço de massas de 80 e um rendimento de 138,24 % sendo este o ensaio onde foi recuperado a maior concentração da enzima. Desta forma, o rendimento e o balanço de massas foram os parâmetros considerados para a escolha da melhor condição de trabalho.

Tabela 5 - Resumo do planejamento fatorial 2³ com ponto central aplicado na purificação da enzima utilizando SMDFA.

Ensaio	Caldo <i>P.restrictum</i> (g)	Triton X-114 (%m/m)	T (°C)	R(Vc/Vd)	K	BM	Rendimento %
1	0,3	6	31	0,72	0,36	48	66,18
2	0,9	6	31	0,65	0,12	45	68,46
3	0,3	10	31	1,07	0,19	80	138,24
4	0,9	10	31	1,58	0,15	31	65,69
5	0,3	6	39	0,68	0,5	55	68,63
6	0,9	6	39	0,77	0,16	28	49,84
7	0,3	10	39	0,88	0,12	39	66,67
8	0,9	10	39	0,94	0,14	41	70,75
9	0,6	8	35	0,94	0,11	39	67,5
10	0,6	8	35	0,94	0,11	39	67,4
11	0,6	8	35	0,94	0,11	38	67,7

Na literatura, pouco se descreve sobre a purificação de proteases por SMDFA. Um trabalho realizado por Barros e colaboradores (2014), estudou uma partição de proteases expressas por *Penicillium restrictum* em um sistema de duas fases aquosas formado por PEG/NAPA. O sistema apresentou elevados valores de balanço de massas e de rendimento, indicando a estabilidade da enzima e a aplicabilidade em processos industriais. Os resultados de separação usando os sistemas mostraram que o SMDFA escolhido pelo autor poderia ser utilizado para purificar ou concentrar protease a partir do caldo fermentado (134).

A Tabela 6 apresenta as etapas de purificação realizadas utilizando a extração líquido-líquido e membranas de filtração. O SMDFA com maior balanço de massa e rendimento foi escolhido para continuar o trabalho. A fração pobre em micelas deste SMDFA escolhido, onde a enzima de interesse se encontrava em maior concentração foi avaliada e o fator de purificação para proteases passou para 10,18 aumentando em 10 vezes a purificação da enzima. Porém após avaliar o perfil proteico através de eletroforese (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) não foi possível observar a purificação, o gel ainda apresentava diversas bandas proteicas.

O SMDFA foi então submetido ao processo de ultrafiltração em membrana de 30 kDa. Onde na fração < 30 kDa a atividade proteolítica encontrada foi igual a 12,8 UI/mL com um fator de purificação igual a 10,4, conforme pode ser visto na Tabela 6. O fator de purificação na fração < 30 kDa apresentou um leve aumento em comparação com o fator de purificação do SMDFA.

E através de avaliação do perfil proteico da fração < 30 kDa por eletroforese, confirmou-se a clarificação do meio e a migração parcial das proteínas para o ultrafiltrado, permanecendo somente duas principais bandas conforme apresentado na **Erro! Fonte de referência não encontrada..** As duas principais bandas apresentaram massa molecular de aproximadamente 19,2 e 30,5kDa respectivamente. Na Figura 7 podemos ver a presença de duas bandas em gel de zimograma que confirmam a atividade proteolítica das mesmas.

Tabela 6 – Etapas de purificação das proteases presentes no caldo fermentado após SMDFA e membrana de 30kDa.

Frações	Proteína (mg/mL)	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg prot)	Rendimento (%)	Fator de purificação (vezes)
Bruto	0,344	52,94	153,9	100,0	1,00
> 100 kDa	0,626	35,50	56,7	67,06	0,37
< 100 kDa	0,208	34,05	163,7	64,32	1,06
SMDFA	0,009	14,10	1566,7	26,63	10,18
< 30 kDa	0,008	12,80	1600,0	24,18	10,4

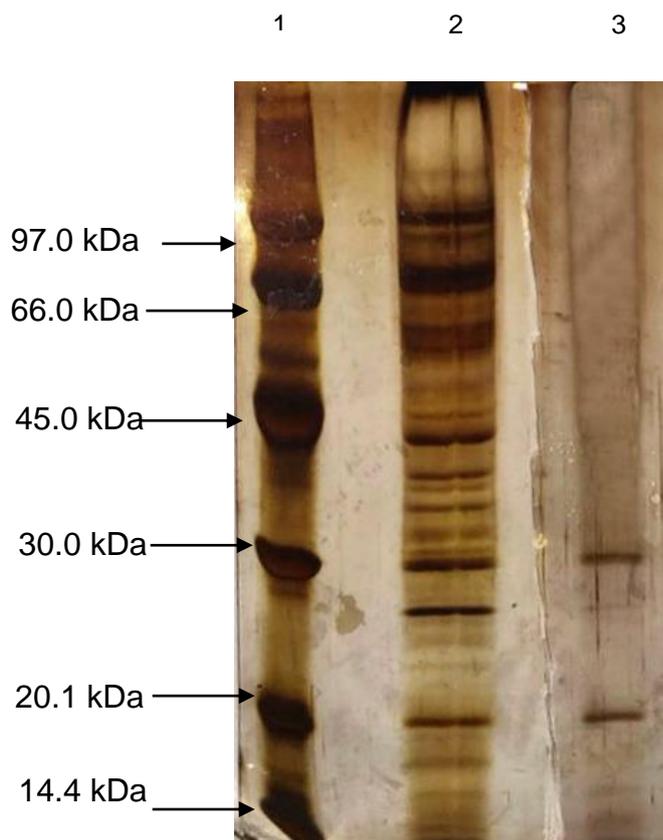


Figura 6 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS–PAGE corado com nitrato de prata. Linha (1) – Marcador de baixo peso molecular (14.4–97.0 kDa, LMW Kit, GE-Healthcare), Linha (2) – fração pobre em micelas do SMDFA, Linha (3) – fração < 30 kDa.



Figura 7 – Gel para zimograma contendo gelatina 1% em sua composição para revelar atividade proteolítica. Linha 1: fração < 30 kDa.

Este resultado está próximo ao da literatura. Onde, encontra-se relatado que em geral, as massas moleculares de proteases microbianas são raramente maiores do que 50 kDa. Um exemplo, pode ser dado com o trabalho de Pagiannini e colaboradores (2014) que descreveram uma protease purificada de *P. nalgiaevae* com massa molecular de 45,2 kDa. Zhu e colaboradores (2009) também descreveram uma protease purificada de *P. chrysogenum* FS010 que apresentou massa molecular de 41 kDa (46). Em outro estudo, descrito por Chrzanowska e colaboradores (1995) purificou-se uma aspártico proteinase a partir de *Penicillium camemberti* que apresentou massa molecular de 33,5 kDa (135).

As serina proteases são largamente distribuídas em fungos filamentosos. Vários estudos demonstram que serina proteases alcalinas e neutras foram isoladas a partir de filtrados de cultura de várias espécies de *Penicillium*. Serina proteases alcalinas isoladas a partir de *Penicillium spp.* geralmente possuem massas na faixa de 32-45 kDa, enquanto que as respectivas enzimas de *Aspergillus spp.* apresentam uma gama mais ampla de massas moleculares (136).

Desta forma, este trabalho reforça a teoria que a aplicação de Sistemas Micelares de Duas Fases Aquosas é uma potencial tecnologia para a separação de proteínas e enzimas, como ferramenta para compor o processo de purificação.

Em comparação com outras técnicas de purificação tradicionais, SMDFA apresenta várias vantagens, tais como alto teor de água das duas fases (80%, w / w) e biocompatibilidade, baixa tensão interfacial (minimiza a degradação de biomoléculas), alta capacidade e rendimento, além da possibilidade de reciclagem de surfactante. Além disso, devido à sua simplicidade, baixo custo e facilidade de aumento de escala, este processo tem sido amplamente investigado para aplicações industriais (137).

5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES PRESENTES NA FASE POBRE EM MICELAS DO SMDFA TRITON X-114/TAMPÃO FOSFATO

5.3.1 Avaliação do efeito do pH e temperatura sobre as enzimas purificadas

Após a determinação das melhores condições de recuperação da enzima em SMDFA seguido da ultrafiltração por membrana de 30 kDa os valores de pH e temperatura ótima para as proteases parcialmente purificadas foram determinados.

Conforme mostra a Figura 8, as proteases presentes na fração < 30 kDa apresentaram um pH ótimo em 8,0 com atividade proteolítica de 24,3 U/mL, mantendo a atividade ainda em pH 9,0 com um declínio de atividade em pH 10,0. Segundo Papagianni e colaboradores (2014) uma protease purificada de *P. nalgiovensis* PNA9 foi ativa na gama de pH de 4,0 a 10,0, com um pH ótimo a 8,0. E o perfil de estabilidade do pH para o estudo mostrou que a protease foi altamente e estável entre pH 8,0 e 9,0 (73).

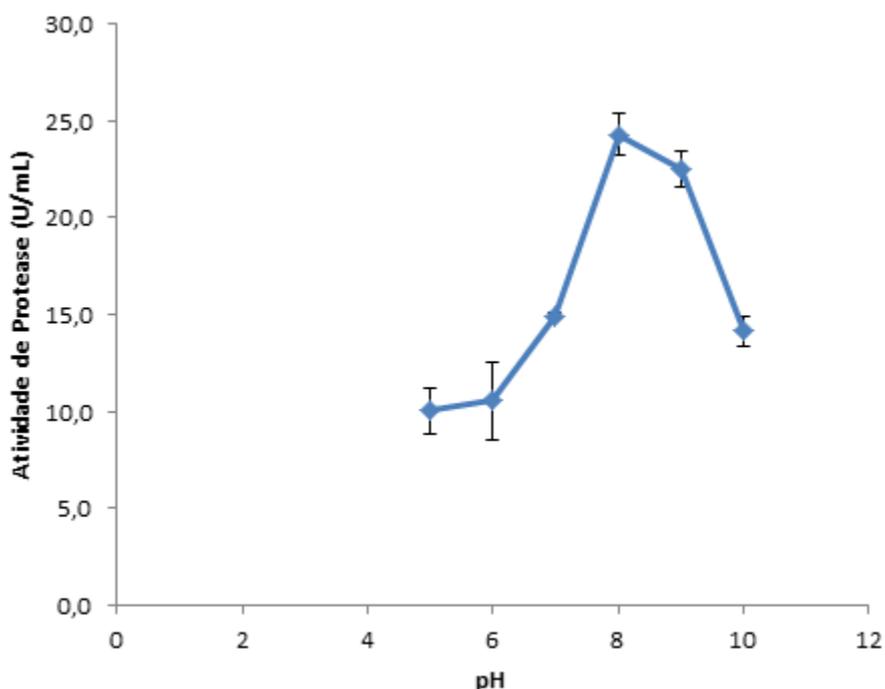


Figura 8 - Efeito do pH na enzima protease parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA.

De acordo com Beg e Gupta (2003), as proteases comerciais de origem microbiana, geralmente possuem atividade ótima na faixa de pH que varia de 8,0-12,0, o que as torna de grande interesse para utilização em formulações de detergentes, devido ao pH alcalino desses produtos (138). O valor do pH da solução detergente é um importante parâmetro para determinar a viabilidade da aplicação de um determinado tipo de enzima. A Alcalase®, enzima muito utilizada na indústria de detergentes, possui pH ótimo de atuação na faixa de 8,0-9,0 (11).

Um estudo com o fungo *P. digitatum*, a enzima apresentou uma boa atividade sobre um amplo intervalo de temperatura, com uma temperatura ótima de 55 °C e um pH ótimo de 7,0, o que pode ser benéfico para potencial de aplicação em detergentes. Outras proteases de fungos tais como *Aspergillus nidulans* (139), *Aspergillus parasiticus* (140) e *A. clavatus* CCT2759 (141) apresentaram pH ótimo entre 8,0 e 9,5, e estes achados estão de acordo com os resultados de *P. restrictum*.

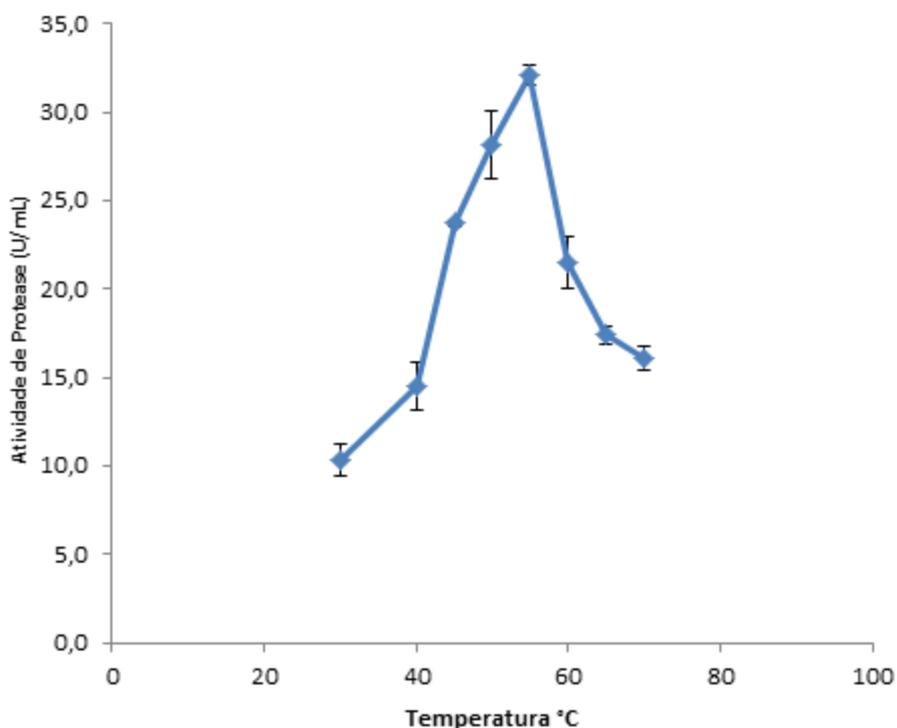


Figura 9 - Efeito da temperatura na enzima protease parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA.

Nascimento e colaboradores (2006) relataram um pH ótimo de 8,0 com atividade de 70 U/mg em uma protease produzida por *Bacillus sp.* SMIA-2, sendo ela

ativa também em uma ampla faixa de pH (11). Resultados semelhantes relacionados ao pH ótimo de proteases foram encontrados por vários autores para diferentes microrganismos estudados. Germano e colaboradores (2003), encontraram um pH ótimo, para protease produzida por *Penicillium sp.*, na faixa de 6,0 a 8,0 (67).

As enzimas parcialmente purificadas na fração < 30 kDa apresentaram atividade máxima a 55°C, perdendo 33 % da atividade a 60°C, conforme a Figura 9.

Estes resultados são próximos aos de duas proteases microbianas produzidas para utilização na indústria de detergentes, a Alcalase® e a Esperase®, que possuem temperaturas ótimas de atividade por volta de 60°C, com rápida perda de atividade em temperaturas maiores que 70°C (11).

5.3.2 Avaliação da estabilidade térmica das enzimas purificadas na fração <30 kDa

No teste para avaliar a estabilidade térmica das enzimas presentes na fração <30 kDa, com uma hora de incubação a atividade proteolítica foi de 12,9 U/mL e com duas horas de incubação houve um declínio de 37,21% em relação a atividade inicial, conforme a Figura 10.

Em um estudo com o fungo *P. digitatum* o perfil de estabilidade do pH mostrou que a protease purificada era altamente estável numa gama de pH de 7,0-11,0 com 80% da atividade inicial a pH 10,0-11,0 e 70% da sua atividade a pH 6,0 com estabilidade máxima a pH 7,0. (7).

Zhu e colaboradores (2009) caracterizaram uma protease purificada expressa por *Penicillium chrysogenum*. A temperatura ótima foi de 35 °C, um valor 10 à 15 °C inferior ao que normalmente é utilizada na indústria. A enzima perdeu quase 90% de atividade na temperatura de 60°C (46). Espósito e colaboradores (2010) relataram uma atividade ótima de 60°C para proteases extraídas a partir de vísceras de *Colossoma macropomum*, ela permaneceu estável termicamente após ter sido

incubada na temperatura ótima mantendo 86% de atividade após 30 minutos de incubação (74).

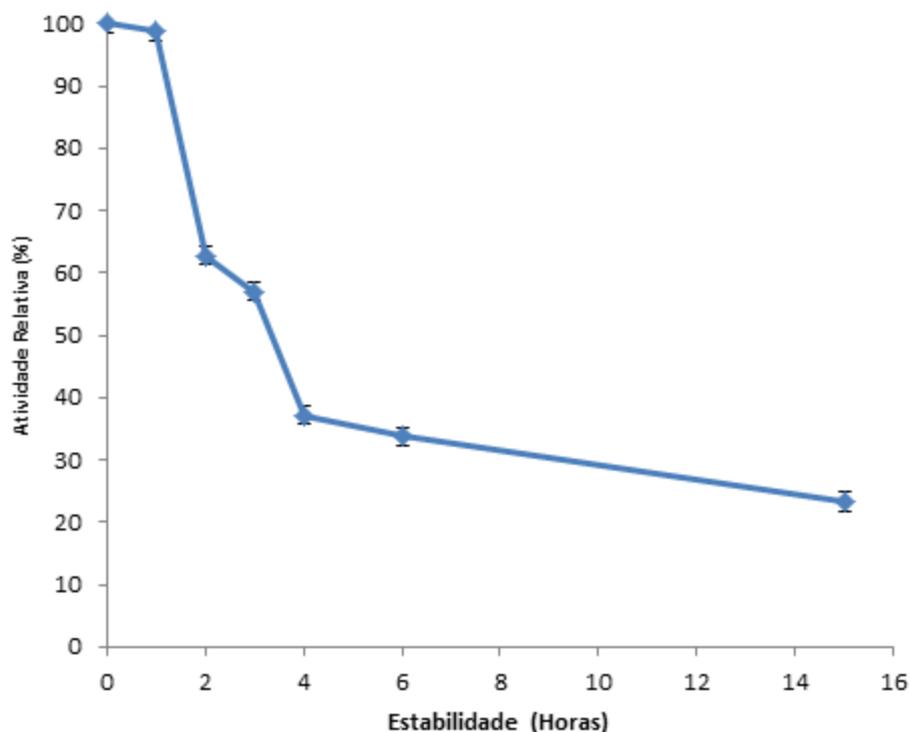


Figura 10 - Determinação da estabilidade da enzima parcialmente purificada na fração < que 30 kDa após SMDFA, na temperatura de 55°C e pH 8,0.

5.3.3 Efeito de inibidores, íons metálicos, detergentes iônicos, não iônicos e comerciais na atividade enzimática

Foram avaliados os efeitos de vários inibidores de protease e íons metálicos sobre a atividade enzimática das enzimas parcialmente purificadas.

Segundo Godfrey e West (1996), mais de 75% de todas as enzimas conhecidas requerem a presença de íons metálicos para ativar sua atividade catalítica, sendo que concentrações extremamente baixas destes compostos podem ser suficientes para aumentar sua estabilidade térmica (142).

Como apresentado nos resultados da Tabela 7 ocorreu uma leve inibição da atividade proteolítica por PMSF.

Também foi avaliado o efeito de diferentes íons metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{3+}) na concentração de 1 mM sobre a atividade da protease como apresentam os resultados da Tabela 7. O íon Mg^{+2} induziu a um aumento da atividade da enzima e os íons Zn^{+} e Fe^{3+} foram os maiores repressores da atividade enzimática reduzindo 25 % o nível de atividade residual. Gupta e colaboradores (2006) relataram que queratinases geralmente são inibidas pelo íon Zn^{2+} e geralmente estimuladas pelos íon Mg^{+2} (79). Um estudo realizado por Ferrero e colaboradores (1996) observaram na produção de uma protease alcalina produzida a partir de *Bacillus licheniformis* MIR 29 que o EDTA não inibiula enzima (143). Este resultado é semelhante ao obtido neste estudo.

Segundo Paliwal e colaboradores (1994), os íons metálicos como Mg^{+2} e Ca^{+2} possuem a função de aumentar ou estabilizar a atividade da enzima, confirmando que estes cátions participam na estabilização da estrutura de proteases e são necessários para a proteção contra a desnaturação térmica (144).

Tabela 7 - Efeito de inibidores enzimáticos e íons metálicos sobre as enzimas parcialmente purificadas.

Compostos	Concentração	Atividade Relativa (%)
Controle		100,0 ± 0,11
EDTA	1,0 mM	122,9 ± 0,01
Iodoacetamina	1,0 mM	110,4 ± 0,02
PMSF	1,0 mM	87,5 ± 0,05
CuSO₄	1,0 mM	77,1 ± 0,01
ZnSO₄	1,0 mM	25,0 ± 0,13
AgCl	1,0 mM	60,4 ± 0,15
CaCl₂	1,0 mM	97,9 ± 0,02
MgCl₂	1,0 mM	114,6 ± 0,15
FeCl₃	1,0 mM	25,0 ± 0,01

Foram avaliados os efeitos de detergentes iônicos, não iônicos e comerciais sobre a atividade da enzima parcialmente purificada. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Os detergentes iônicos (SDS) e não iônicos (Triton X-100 e Tween 80) que foram testados induziram um aumento da atividade proteolítica da enzima, podendo-se sugerir que a enzima possui potencial para aplicação na indústria de detergentes onde empregam surfactantes como insumos. Foram avaliados 3 detergentes líquidos de roupas de uso comercial. Pela atividade enzimática apresentada, os detergentes B e C apresentaram as maiores influências no aumento da atividade proteolítica, sugerindo uma possível aplicação das enzimas parcialmente purificadas na fração <30kDa.

Tabela 8 - Efeito de detergentes iônicos, não iônicos e comerciais nas proteases parcialmente purificadas.

Compostos	Concentração*	Atividade Relativa (%)
Controle		100,0 ± 0,13
Triton X-100	1%	158,2 ± 0,09
Tween 80	1%	178,1 ± 0,01
SDS	1%	131,6 ± 0,05
A	1%	102,0 ± 0,03
B	1%	150,0 ± 0,01
C	1%	143,0 ± 0,02

*Concentração de detergentes testados

Em comparação com a literatura, um estudo relata que a serina-protease alcalina de *P. nalgiovensis* PNA9 também foi altamente estável na presença dos tensoativo não-iônicos Tween 80 e Triton X-100 (73).

A utilização de proteases em formulações detergentes requer que estas enzimas possuam elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, que sejam efetivas em baixas quantidades (0,4-0,8 %) e compatíveis com vários detergentes comerciais (75).

6 CONCLUSÃO

O fungo *Penicillium restrictum* foi capaz de produzir protease em meio contendo 1% de farelo de trigo como fonte de carbono e nitrogênio.

O SMDFA formado por adição de 10% (m/m) caldo fermentado, 10% (m/m) Triton X114 e mantido a 31°C, foi eficaz na clarificação do meio de cultivo justificando sua aplicação no processo de purificação como uma das etapas do processo.

Após o SMDFA a ultrafiltração por membranas de 30 kDa resultou na parcial purificação de duas proteases extracelulares.

As proteases parcialmente purificadas foram caracterizadas e pode-se quantificar uma atividade ótima destas enzimas em valores de pH igual a 8,0 e de temperatura igual a 55 ° C, esses resultados são interessantes para a indústria de detergentes.

A enzima foi levemente inibida por PMSF bastante inibida pelos íons Zn^+ e Fe^3 e o íon metálico Mg^{+2} estimulou a atividade da enzima produzida.

Os resultados obtidos no estudo são de grande importância, apresentando possível aplicação biotecnológica na indústria de detergentes, porém se faz necessários a continuidade do estudo, com testes de aplicação para sua utilização na indústria.

7 REFERÊNCIAS

1. Lehninger AL, Nelson DI, Cox MM. Princípios de Bioquímica. São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos, 2007.
2. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1998;62(3):597-635.
3. Vojcic L, Pitzler C, Körfer G, Jakob F, Martinez R, Maurer K-H, et al. Advances in protease engineering for laundry detergents. *New biotechnology*. 2015.
4. Zanphorlin LM, Cabral H, Arantes E, Assis D, Juliano L, Juliano MA, et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochemistry*. 2011;46(11):2137-43.
5. González-Rábade N, Badillo-Corona JA, Aranda-Barradas JS, del Carmen Oliver-Salvador M. Production of plant proteases in vivo and in vitro—a review. *Biotechnology advances*. 2011;29(6):983-96.
6. Benkiar A, Nadia ZJ, Badis A, Rebzani F, Soraya BT, Rekik H, et al. Biochemical and molecular characterization of a thermo-and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2013;83:129-38.
7. Aissaoui N, Abidi F, Mahat S, Marzouki MN. Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum*—use in bioactive peptides production. *Journal of basic microbiology*. 2014;54(S1):S178-S89.
8. Kumar S, Sharma NS, Saharan MR, Singh R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. *Process Biochemistry*. 2005;40(5):1701-5.
9. Gupta R, Beg Q, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied microbiology and biotechnology*. 2002;60(4):381-95.
10. Soccol CR, Vandenberghe LPS. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. *Biochemical Engineering Journal*. 2003;13(2):205-18.
11. Nascimento WCAd, Martins MLL. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2006.

12. Nikas YJ, Liu CL, Srivastava T, Abbott NL, Blankschtein D. Protein partitioning in two-phase aqueous nonionic micellar solutions. *Macromolecules*. 1992;25(18):4797-806.
13. Rangel-Yagui CO, Lam H, Kamei DT, Wang DIC, Pessoa A, Blankschtein D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/cationic) micellar systems. *Biotechnology and bioengineering*. 2003;82(4):445-56.
14. Klink CA, Machado RB. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*. 2005;1(1):147-55.
15. Takahashi JA, de Castro MCM, Souza GG, Lucas EMF, Bracarense AAP, Abreu LM, et al. Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*. 2008;18(4):198-204.
16. Ratter JA, Ribeiro JF, Bridgewater S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of botany*. 1997;80(3):223-30.
17. Beuchle R, Grecchi RC, Shimabukuro YE, Seliger R, Eva HD, Sano E, et al. Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach. *Applied Geography*. 2015;58:116-27.
18. Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GAB, Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 2000;403(6772):853-8.
19. Quirino BF, Pappas GJ, Tagliaferro AC, Collevatti RG, Neto EL, da Silva MRSS, et al. Molecular phylogenetic diversity of bacteria associated with soil of the savanna-like Cerrado vegetation. *Microbiological research*. 2009;164(1):59-70.
20. Yamada T. The cerrado of Brazil: a success story of production on acid soils. *Soil Science & Plant Nutrition*. 2005;51(5):617-20.
21. Azeredo LAI, Castilho LR, Leite SGF, Coelho RRR, Freire DMG. Protease production by *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*: Springer; 2003. p. 749-55.
22. Sperandio EM, do Vale HMM, Moreira GAM. Yeasts from native Brazilian Cerrado plants: Occurrence, diversity and use in the biocontrol of citrus green mould. *Fungal biology*. 2015;119(11):984-93.
23. Furlanetto C, Dianese JC. Some coelomycetes from central Brazil. *Mycological Research*. 1998;102(01):19-29.
24. Li Q, Yi L, Marek P, Iverson BL. Commercial proteases: Present and future. *FEBS letters*. 2013;587(8):1155-63.

25. Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Lin FH. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2011;42(2):298-304.
26. Vermelho AB, Melo ACN, Sá MHB, Santos ALS, d'Avila-Levy CM, Couri S, et al. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas. *Enzimas em biotecnologia-Produção, aplicações e mercado*. 2008:273-87.
27. Félix CR, Noronha EF, De Marco JL. Proteases: características e aplicações industriais. SAID, S; PIETRO, RCLR *Enzimas como agentes Biotecnológicos* Ribeirão Preto: Legis summa. 2004:327-47.
28. Vishwanatha KS, Rao AGA, Singh SA. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*. 2009;114(2):402-7.
29. Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic acids research*. 2012;40(D1):D343-D50.
30. Silva DCV, Tiago PV, De Souza-Motta CM. Isolamento e seleção de fungos filamentosos do solo de sistemas agroflorestrais do Município de Bom Jardim (PE) com base na capacidade de produção de enzimas hidrolíticas¹. *Revista Brasil Bot*. 2011;34(4):607-10.
31. Vishwanatha KS, Rao AGA, Singh SA. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;85(6):1849-59.
32. Rai SK, Mukherjee AK. Optimization of production of an oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. *Biochemical Engineering Journal*. 2011;54(1):47-56.
33. Kumari M, Sharma A, Jagannadham MV. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. *Food chemistry*. 2012;131(4):1295-303.
34. Gupta R, Beg Q, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied microbiology and biotechnology*. 2002;59(1):15-32.
35. Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*. 2005;40(8):2689-94.
36. Chanalia P, Gandhi D, Jodha D, Singh J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. *Reviews in Medical Microbiology*. 2011;22(4):96-101.

37. Vranova V, Rejsek K, Formanek P. Proteolytic activity in soil: a review. *Applied soil ecology*. 2013;70:23-32.
38. Ikram-UI-haq HM, Umer H. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 2006;1:23-5.
39. Muthulakshmi C, Gomathi D, Kumar DG, Ravikumar G, Kalaiselvi M, Uma C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. *Biological*. 2011:3137.
40. Djamel C, Ali T, Nelly C. Acid protease production by isolated species of *Penicillium*. *Eur J Sci Res*. 2009;25(3):469-77.
41. Kranthi VS, Rao DM, Jaganmohan P. Comparative Production of Protease by Locally Isolated *Aspergillus* Species Using Different Oil Seed Cakes. *Advances in Biological Research*. 2013;7(1):04-8.
42. Laxman RS, Sonawane AP, More SV, Rao BS, Rele MV, Jogdand VV, et al. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*. 2005;40(9):3152-8.
43. Chaabouni SE, Belguith H, Hassairi I, M'Rad K, Ellouz R. Optimization of cellulase production by *Penicillium occitanis*. *Applied microbiology and biotechnology*. 1995;43(2):267-9.
44. Mikhailova RV, Sapunova LI, Lobanok AG. Biosynthesis of pectinlyases in *Penicillium adametzii*, *P. citrinum* and *P. janthinellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1994;10(4):457-61.
45. Hashimoto H, Iwaasa T, Yokotsuka T. Thermostable acid protease produced by *Penicillium duponti* K1014, a true thermophilic fungus newly isolated from compost. *Applied microbiology*. 1972;24(6):986-92.
46. Zhu H-Y, Tian Y, Hou Y-H, Wang T-h. Purification and characterization of the cold-active alkaline protease from marine cold-adaptive *Penicillium chrysogenum* FS010. *Molecular biology reports*. 2009;36(8):2169-74.
47. Hajji M, Kanoun S, Nasri M, Gharsallah N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*. 2007;42(5):791-7.
48. Agrawal D, Patidar P, Banerjee T, Patil S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2004;39(8):977-81.
49. Pandey A, Soccol CR, Mitchell D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*. 2000;35(10):1153-69.

50. Carvalho RVd, Corrêa TLR, Silva JCMD, Viana AP, Martins MLL. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 2008;28(2):380-6.
51. Silva BLd. Produção e caracterização da protease coagulante obtida por fermentação submersa a partir do fungo termofílico *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31. 2013.
52. Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*. 2009;27(2):185-94.
53. Silva Delabona P, Pirolta RDPB, Codima CA, Tremacoldi CR, Rodrigues A, Farinas CS. - Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes.- 243.
54. Sanchez OJ, Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource technology*. 2008;99(13):5270-95.
55. Mamma D, Kourtoglou E, Christakopoulos P. Fungal multienzyme production on industrial by-products of the citrus-processing industry. *Bioresource technology*. 2008;99(7):2373-83.
56. Siqueira FG, de Siqueira EG, Jaramillo PMD, Silveira MHL, Andreaus J, Couto FA, et al. The potential of agro-industrial residues for production of holocellulase from filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2010;64(1):20-6.
57. Sathishkumar R, Ananthan G, Arun J. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2015.
58. Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp 2006.
59. Castro RJS, Sato HH. 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*. 2013;49:813-21.
60. Castro RJS, Nishide TG, Sato HH. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2014;3(4):236-45.
61. Elhoul MB, Jaouadi NZ, Rekik H, Bejar W, Touioui SB, Hmidi M, et al. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkaline protease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *International journal of biological macromolecules*. 2015;79:871-82.

62. Speranza P, de Oliveira Carvalho P, Macedo GA. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2011;72(3):181-6.
63. Farnell E, Rousseau K, Thornton DJ, Bowyer P, Herrick SE. Expression and secretion of *Aspergillus fumigatus* proteases are regulated in response to different protein substrates. *Fungal biology*. 2012;116(9):1003-12.
64. Haddar A, Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Frikha F, Nasri M, Kamoun AS. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010;110(3):288-94.
65. Kučera M. The production of toxic protease by the entomopathogenous fungus *Metarhizium anisopliae* in submerged culture. *Journal of Invertebrate Pathology*. 1981;38(1):33-8.
66. Souza PM. Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; 2015.
67. Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32(2):246-51.
68. Mukhtar H. Production of acid protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. *Pakistan Journal of Zoology*. 2009;41(4):253-60.
69. Yang S-S, Wang J-Y. Protease and amylase production of *Streptomyces rimosus* in submerged and solid state cultivations. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 1999;40.
70. Ladeira AS, Andrade MV, Delatorre AB, Perez VH, Martins LLM. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Quim Nova*. 2010;33(2):324-8.
71. Kim JM, Lim WJ, Suh HJ. Feather-degrading *Bacillus* species from poultry waste. *Process Biochemistry*. 2001;37(3):287-91.
72. Farag AM, Hassan MA. Purification, characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;34(2):85-93.
73. Papagianni M, Sergelidis D. Purification and biochemical characterization of a novel alkaline protease produced by *Penicillium nalgioense*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172(8):3926-38.

74. Silva Espósito T, de Souza Bezerra RO. Resíduos do processamento de peixes comerciais como fonte de proteases alcalinas e seu potencial uso biotecnológico: Universidade Federal de Pernambuco; 2010.
75. Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology advances*. 1999;17(7):561-94.
76. Haddar A, Agrebi R, Bougatef A, Hmidet N, Sellami-Kamoun A, Nasri M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojaviensis* A21: purification, characterization and potential application as a laundry detergent additive. *Bioresource Technology*. 2009;100(13):3366-73.
77. Moreira KA, Albuquerque BF, Teixeira MFS, Porto ALF, Lima Filho JL. Application of protease from *Nocardiosis* sp. as a laundry detergent additive. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2002;18(4):309-15.
78. Gessesse A, Hatti-Kaul R, Gashe BA, Mattiasson BO. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32(5):519-24.
79. Gupta R, Ramnani P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;70(1):21-33.
80. Maurer K-H. Detergent proteases. *Current opinion in Biotechnology*. 2004;15(4):330-4.
81. Phadatare SU, Deshpande VV, Srinivasan MC. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8. 20): enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and microbial technology*. 1993;15(1):72-6.
82. Rao CS, Sathish T, Ravichandra P, Prakasham RS. Characterization of thermo-and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*. 2009;44(3):262-8.
83. Banerjee UC, Sani RK, Azmi W, Soni R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process biochemistry*. 1999;35(1):213-9.
84. Singh J, Batra N, Sobti RC. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*. 2001;36(8):781-5.
85. Macedo AJ, da Silva WOB, Gava R, Driemeier D, Henriques JAP, Termignoni C. Novel keratinase from *Bacillus subtilis* S14 exhibiting remarkable dehairing capabilities. *Applied and environmental microbiology*. 2005;71(1):594-6.
86. Zambare V, Nilegaonkar S, Kanekar P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New biotechnology*. 2011;28(2):173-81.

87. Verma A, Pal HS, Singh R, Agarwal S. Potential of alkaline protease isolated from *Thermoactinomyces* sp. RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process. *International Journal of Agriculture Environment & Biotechnology*. 2011;4(2):173-8.
88. Neto H, Abou YA. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*: Universidade de São Paulo; 2012
89. Huang Q, Peng Y, Li X, Wang H, Zhang Y. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease with dehairing function from *Bacillus pumilus*. *Current microbiology*. 2003;46(3):0169-73.
90. Anandan D, Marmer WN, Dudley RL. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamaritii*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2007;34(5):339-47.
91. Schmidell W, Lima UdA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia industrial*: Edgard Blücher Ltda. São Paulo; 2001.
92. Tsuruoka N, Nakayama T, Ashida M, Hemmi H, Nakao M, Minakata H, et al. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. *Applied and environmental microbiology*. 2003;69(1):162-9.
93. Sukhosyrova EA, Nikitina ZK, Yakovleva MB, Veshchikova EV, Bykov VA. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2003;135(5):447-51.
94. Sim Y-C, Lee S-G, Lee D-C, Kang B-Y, Park K-M, Lee J-Y, et al. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. *Biotechnology letters*. 2000;22(2):137-40.
95. Wilson TJ, Singh RK. Proteases as modulators of tumor–stromal interaction: primary tumors to bone metastases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*. 2008;1785(2):85-95.
96. Hamilton JR. Protease-activated receptors as targets for antiplatelet therapy. *Blood reviews*. 2009;23(2):61-5.
97. Pessoa Junior A, Kilikian BV. Purificação de produtos biotecnológicos. *Purificação de produtos biotecnológicos*: Manole; 2005.
98. Rabelo APB, Tambourgi EB, Pessoa A. Bromelain partitioning in two-phase aqueous systems containing PEO–PPO–PEO block copolymers. *Journal of Chromatography B*. 2004;807(1):61-8.

99. Fedatto LM. Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira: Universidade de São Paulo; 2004.
100. Azevedo AM, Rosa PAJ, Ferreira IF, Aires-Barros MR. Chromatography-free recovery of biopharmaceuticals through aqueous two-phase processing. *Trends in biotechnology*. 2009;27(4):240-7.
101. Silva LHM, Hespanhol da Silva MC, de Aquino RAN, Francisco KR, Cardoso MVC, Minim LA, et al. Nitroprusside-PEO enthalpic interaction as a driving force for partitioning of the [Fe (CN) 5NO] 2-anion in aqueous two-phase systems formed by poly (ethylene oxide) and sulfate salts. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(46):23540-6.
102. Padilha GdS. Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia*: Universidade Estadual de Campinas, São Paulo; 2010.
103. Ferreira JF, Sbruzzi D, Barros KVG, Ehrhardt DD, Basile E. Purification of Bromelain Enzyme from Curauá (*Ananas erectifolius* LB Smith) White Variety, by Aqueous Two-Phase System PEG 4000/Potassium Phosphate. *J Chem*. 2014;8:395-9.
104. Barros KVG. Sistema de duas fases aquosas NaPA/PEG aplicado na purificação de proteases produzidas por fungos filamentosos: UNB 2015.
105. Asker MMS, Mahmoud MG, El Shebwy K, el Aziz MSA. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2013;11(2):103-9.
106. Oliveira Rangel-Yagui C. Sistemas micelares de duas fases aquosas aplicados à purificação de enzimas: Universidade de São Paulo; 2003.
107. Israelachvili JN. Intermolecular and surface forces: revised third edition: Academic press; 2011.
108. Tanford C. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* 2d Ed: J. Wiley.; 1980.
109. Chevalier Y, Zemb T. *The structure of micelles and microemulsions*: IOP Publishing; 1990. 279 p.
110. Puvvada S, Blankschtein D. Molecular-thermodynamic approach to predict micellization, phase behavior and phase separation of micellar solutions. I. Application to nonionic surfactants. *The Journal of chemical physics*. 1990;92(6):3710-24.
111. Kamei DT. *Protein and viral partitioning in two-phase aqueous micellar systems*: Massachusetts Institute of Technology; 2001.

112. Liu CL, Nikas YJ, Blankschtein D. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. *Biotechnology and bioengineering*. 1996;52(2):185-92.
113. Lopes AM, Santos-Ebinuma VC, Pessoa Júnior A, Rangel-Yagui CO. Influence of salts on the coexistence curve and protein partitioning in nonionic aqueous two-phase micellar systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2014;31(4):1057-64.
114. Liu C-I, Kamei DT, King JA, Wang DIC, Blankschtein D. Separation of proteins and viruses using two-phase aqueous micellar systems. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1998;711(1):127-38.
115. Kamei DT, Wang DIC, Blankschtein D. Fundamental investigation of protein partitioning in two-phase aqueous mixed (nonionic/ionic) micellar systems. *Langmuir*. 2002;18(8):3047-57.
116. Yan X, Souza MA, Pontes MZR, Vitolo M, Pessoa Júnior A. Liquid-liquid extraction of enzymes by affinity aqueous two-phase systems. *Brazilian archives of biology and technology*. 2003;46(4):741-50.
117. Linder MB, Qiao M, Laumen F, Selber K, Hyytiä T, Nakari-Setälä T, et al. Efficient purification of recombinant proteins using hydrophobins as tags in surfactant-based two-phase systems. *Biochemistry*. 2004;43(37):11873-82.
118. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *Journal of Biological Chemistry*. 1981;256(4):1604-7.
119. Holm C, Fredrikson G, Belfrage P. Demonstration of the amphiphilic character of hormone-sensitive lipase by temperature-induced phase separation in Triton X-114 and charge-shift electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261(33):15659-61.
120. Rosa PAJ, Azevedo AM, Sommerfeld S, Bäcker W, Aires-Barros MR. Aqueous two-phase extraction as a platform in the biomanufacturing industry: economical and environmental sustainability. *Biotechnology advances*. 2011;29(6):559-67.
121. Jaramillo PMD. Produção, caracterização e aplicação biotecnológica de pectinases produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* cultivado em casca de maracujá-amarelo: UNB 2014.
122. Charney J, Tomarelli RM. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem*. 1947;171(2):501-5.
123. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976;72(1):248-54.

124. Van Der Meeren P, Cocquyt J, Flores S, Demeyere H, Declercq M. Quantifying wetting and wicking phenomena in cotton terry as affected by fabric conditioner treatment. *Textile research journal*. 2002;72(5):423-8.
125. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*. 1970;227(5259):680-5.
126. Kathiresan SM. Alkaline Protease Production by *Penicillium felhitatum* Isolated from Mangrove Sediment. *International Journal of Biological Chemistry*. 2007;1(2):98-103.
127. Rodarte MP, Dias DR, Vilela DM, Schwan RF. Proteolytic activities of bacteria, yeasts and filamentous fungi isolated from coffee fruit (*Coffea arabica* L.). *Acta Scientiarum Agronomy*. 2011;33(3):457-64.
128. Gombert AK, Pinto AL, Castilho LR, Freire DMG. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. *Process Biochemistry*. 1999;35(1):85-90.
129. Houmard J, Raymond M-N. Further characterization of the *Penicillium roqueforti* acid protease. *Biochimie*. 1979;61(8):979-82.
130. Durand-Poussereau N, Fevre M. Characterization of a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential use for protein production. *Journal of biotechnology*. 1996;51(1):97-105.
131. Larsen MD, Kristiansen KR, Hansen TK. Characterization of the proteolytic activity of starter cultures of *Penicillium roqueforti* for production of blue veined cheeses. *International journal of food microbiology*. 1998;43(3):215-21.
132. Maria de Barros Rodrigues P, das Graças Carneiro da Cunha MO. Produção de protease pelo *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Universidade Federal de Pernambuco; 2008.
133. Habert AC. Processos de separação por membranas: Editora E-papers; 2006.
134. Barros KVG, Souza PM, Freitas MM, Ferreira Filho EX, Junior AP, Magalhães PO. PEG/NaPA aqueous two-phase systems for the purification of proteases expressed by *Penicillium restrictum* from Brazilian Savanna. *Process Biochemistry*. 2014;49(12):2305-12.
135. Chrzanowska J, Kolaczowska M, Dryjański M, Stachowiak D, Polanowski A. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: purification, properties, and substrate specificity. *Enzyme and microbial technology*. 1995;17(8):719-24.
136. Morya VK, Yadav S, Kim E-K, Yadav D. In silico characterization of alkaline proteases from different species of *Aspergillus*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2012;166(1):243-57.

137. Mazzola PG, Lopes AM, Hasmann FA, Jozala AF, Penna TCV, Magalhaes PO, et al. Liquid–liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of chemical technology and biotechnology*. 2008;83(2):143-57.
138. Beg QK, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;32(2):294-304.
139. Charles P, Devanathan V, Anbu P, Ponnuswamy MN, Kalaichelvan PT, Hur BK. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of basic microbiology*. 2008;48(5):347-52.
140. Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*. 2003;38(11):1553-8.
141. Tremacoldi CR, Monti R, Selistre-De-Araújo HS, Carmona EC. Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2007;23(2):295-9.
142. Godfrey T, West S. Textiles. *Industrial enzymology*. 1996:360-71.
143. Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigori MD, Sineriz F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45(3):327-32.
144. Paliwal N, Singh SP, Garg SK. Cation-induced thermal stability of an alkaline protease from a *Bacillus* sp. *Bioresource Technology*. 1994;50(3):209-11.
145. Najafi MF, Deobagkar D, Deobagkar D. Potential application of protease isolated from *Pseudomonas aeruginosa* PD100. *Electronic journal of biotechnology*. 2005;8(2):79-85.
146. Bittencourt MLSA. Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do cerrado brasileiro. Brasília. Tese [Mestrado em Ciências da Saúde] – Universidade de Brasília; 2014.