



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

MONA LISA SOUSA DE ASSIS BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROTEASES EXPRESSAS POR
PENICILLIUM FELLUTANUM E *PENICILLIUM RESTRICTUM*
ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

BRASÍLIA-DF
2014

MONA LISA SOUSA DE ASSIS BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROTEASES EXPRESSAS POR
PENICILLIUM FELLUTANUM E *PENICILLIUM RESTRICTUM*
ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista

BRASÍLIA-DF

2014

MONA LISA SOUSA DE ASSIS BITTENCOURT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PROTEASES EXPRESSAS POR
PENICILLIUM FELLUTANUM E *PENICILLIUM RESTRICTUM*
ISOLADOS DO SOLO DO CERRADO BRASILEIRO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista
(Presidente)
Universidade de Brasília

Profa. Dra. Dâmaris Silveira
(Membro titular interno)
Universidade de Brasília

Dr. Félix Gonçalves de Siqueira
(Membro titular externo)
Embrapa Agroenergia

Profa. Dra. Yris Maria da Fonseca
(Membro suplente)
Universidade de Brasília

BRASÍLIA-DF

2014

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**- Atividade de proteases expressas por fungos filamentosos avaliados após crescimento em estufa com agitação (azul) e sem agitação (vermelho) a 28 °C por 7 dias.....29
- Figura 2** - Organograma geral dos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado utilizados nesse trabalho32
- Figura 3** - Avaliação de proteases expressas por fungos filamentosos *P. fellutanum* e *P. restrictum* após crescimento em meio líquido contendo resíduos agrícolas com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.35
- Figura 4** - Efeito do pH nas atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 1 à 37 °C.....37
- Figura 5** - Efeito da temperatura sobre as atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 8,0 no meio 1.38
- Figura 6** – Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 8,0 presentes no meio 1 a 40 °C (A); 45 °C (B) e 50 °C (C).....39
- Figura 7** – Efeito do pH nas atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 2 à 37 °C.....41
- Figura 8** – Efeito da temperatura sobre as atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 5,0 no meio 2.42
- Figura 9** – Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 5,0 presentes no meio 2 a 40 °C (A); 45 °C (B).43
- Figura 10** – Efeito do pH nas atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 3 à 37 °C44
- Figura 11** – Efeito da temperatura sobre as atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 10,0 e *P. restrictum* em pH 5,0 (vermelho) e em pH 9,0 (verde) no meio 3.45
- Figura 12** - Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 10,0 e *P. restrictum* em pH 5,0 (vermelho) e em pH 9,0 (verde) presentes no meio 3 a 40 °C (A); 45 °C (B) e 55 °C (C)..... 46
- Figura 13** – (A) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com amostras dos extratos brutos produzidos no meio 1: linha (1) marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 queda); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*. (B) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos brutos produzidos no meio 2: linha (1)

marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 queda); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*. (C) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos brutos produzidos no meio 3: linha (1) marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 queda); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*.....49

Figura 14 – Zimograma para atividade proteolítica, bandas com atividade proteolítica produzidas pelo fungo *P. restrictum* no meio 3 indicadas pelas setas na figura: (A) gel após 30 minutos a 40 °C; (B) gel após 6 horas a 40 °C.....50

Figura 15 – Atividades ótimas de proteases extracelulares apresentadas pelos fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* após crescimento nos meios de cultivo 1, 2 e 3 e determinadas em pH ótimo e temperatura ótima para as respectivas enzimas..... 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fungos filamentosos isolados do Cerrado e selecionados para este trabalho	20
Tabela 2 – Composição dos meios de cultivos utilizados para a produção de proteases extracelulares em erlenmeyers.....	22
Tabela 3 – Atividades proteolíticas após cultivo em estufa sem agitação a 28 °C, 7 dias no meio 1	28
Tabela 4 – Valores de pH final do meio de cultivo 1 em estufa com e sem agitação a 28 °C após 7 dias	30
Tabela 5 – Comparativo das atividades proteolíticas extracelulares e valores de pH final dos meios de cultivos 1 e 2 em estufa com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.....	33
Tabela 6 – Resumo dos melhores valores de pH e temperatura para atividade de proteases extracelulares produzidas por <i>P. fellutanum</i> e <i>P. restrictum</i> em estufa com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.....	52
Tabela 7 - Efeito dos íons metálicos e inibidores sobre a atividade das proteases produzidas por <i>P. Restrictum</i>	53

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA (potato dextrose Agar).....	Ágar batata dextrose
BSA (bovine serum albumin).....	Soro albumina bovina
DNS (dinitrosalicylic acid).....	Ácido dinitrosalicílico
ECN (Committee of Enzymatic Nomenclature) ...	Comitê de Nomenclatura Enzimática
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid).....	Ácido Etilenodiaminotetracético
GRAS (generally recognized as safe)	Geralmente considerados como seguros
RDC	Resolução da Diretoria do Colegiado
TEMED (tetramethylethylenediamine).....	N,N,N',N'-tetrametilmetilenodiamino

Dedico esta Dissertação de Mestrado aos meus maiores incentivadores, Esposo Heraldo e filho Caio Henrique, por terem acreditado em mim. Estejam certos de que ela foi feita com muito empenho, afincos e horas de total entrega para sua finalização, pautados na ausência de alguns momentos familiares, porém válidos em presença acadêmica marcante.

AGRADECIMENTOS

- A DEUS, fonte inesgotável de minha superação pessoal.
- A Prof.^a Dra. Pérola Magalhães Batista, pela orientação.
- A CAPES pela bolsa de estudos no ano de 2013 do Mestrado.
- Ao Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos, da Faculdade de Ciências da Saúde, pelo total apoio na realização desta pesquisa.
- Ao meu Pai José Melo (*in memoriam*), que tinha o maior orgulho de me ver vencer os obstáculos, incentivador para que eu não desistisse. Ao senhor meu Pai, fica aqui o meu eterno agradecimento.
- A minha Mãe Maria de Lourdes que sempre me protege e abençoa com suas orações e seu amor incondicional.
- Aos meus familiares, irmãos e sobrinhos, sempre na torcida positiva.
- Aos Professores Dr.^a Yris Fonseca e Dr.^a Dâmaris Silveira.
- As colegas colaboradoras Carolina Canielles, Paula Souza, Raquel, Luana Renata Almeida e Marcela pelas contribuições nas realizações experimentais.
- Ao aluno PIBIC Samuel Cardoso pela ajuda nos procedimentos experimentais.
- As amigas Fabielle Zorzin e Sandra Márcia, pelos momentos introspectivos.

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

Paulo Freire

RESUMO

BITTENCOURT, Mona Lisa Sousa de Assis. **Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanun* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do Cerrado brasileiro.** Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2014.

As proteases se referem a um grupo de enzimas cuja função catalítica é hidrolisar proteínas. Enzimas proteolíticas encontram ampla aplicação em diversas indústrias e preparações farmacêuticas. Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Alguns desses fungos são produtores de uma série de enzimas, como amilases, pectinases e proteases. O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar proteases expressas por fungos filamentosos isolados de diferentes amostras do Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, frente à produção de proteases de interesse industrial e farmacêutico em diversas condições de cultivo. Inicialmente, foi realizada uma triagem para avaliar a capacidade de 17 fungos quanto à produção de protease em meio de cultura contendo Ágar-leite. Oito espécies formaram halo no cultivo em placas de Petri contendo 10% de leite desnatado em Ágar indicando serem produtoras de proteases. Em seguida, quando cultivadas em estufa, no meio *sabouraud*, peptona e leite desnatado, seis espécies de fungos apresentaram altas atividades de protease sendo então cultivadas sob condição de agitação. Uma melhoria nas atividades de protease para as espécies *Aspergillus foetidus*, *Penicillium variotti*, *Penicillium citrinum* e *Penicillium fellutanum* foi obtida quando utilizado o cultivo em *shaker*. Um importante aumento na atividade proteolítica foi obtido para a espécie *P. restrictum* e *P. fellutanum* quando avaliado meio de cultivo contendo resíduo agroindustrial. No meio contendo farelo de trigo como fonte de carbono, a maior atividade proteolítica foi identificada quando realizado cultivo por *P. restrictum* (81,1 UI/mL), a as proteases presentes no meio possuem temperatura ótima igual a 45 °C e pH ótimo em uma faixa de 5,0 a 9,0. Sendo termoestáveis por 2 horas em pH e temperatura ótima. Desta forma, estas enzimas podem ser consideradas promissoras para aplicação industrial.

Palavras chaves: Cerrado, *Aspergillus*, *Penicillium*, Proteases, farelo trigo.

ABSTRACT

BITTENCOURT, Mona Lisa Sousa de Assis. **Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanun* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do Cerrado brasileiro.** Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília 2014.

Proteases are a group of enzymes whose catalytic function is the hydrolysis of proteins. Proteolytic enzymes have wide application in various industries and pharmaceutical preparations. Due to technical and economic advantage, microorganisms are the preferred source of industrial application of protease enzymes, although it can be obtained from animals and plants. Filamentous fungi have been used in many industrial processes for the production of enzymes and metabolites. Some of these fungi are producers of several enzymes as amylases, proteases and pectinases. This work aimed to characterize proteases expressed by filamentous fungi isolated from different samples of the Cerrado of Central Brazil, focusing the production of these enzymes of industrial and/or pharmaceutical interest in different growing conditions. Initially, a screening was performed to assess the ability of 17 fungi initially isolated for production of proteases in culture media containing 10% skim milk in agar. Eight species formed a clear zone surrounding colonies, indicating production of protease. These species were then cultivated in Sabouraud broth, peptone and skim milk. Six species showed high protease activity and were then incubated under agitation. Protease activity for the species *Aspergillus foetidus*, *Penicillium variotti*, *Penicillium citrinum* and *Penicillium fellutanum* improved when used in the cultivation in shaker. A significant increase in proteolytic activity was obtained for the species *Penicillium restrictum* and *Penicillium fellutanum* when evaluated in culture media containing agro industrial residues. In a media containing wheat bran as carbon source, the major proteolytic activity has been identified as performed by growing *Penicillium restrictum* (81.1 IU/mL). Proteases present in the medium have an excellent temperature of 45 °C and optimum pH in a range 5.0 to 9.0. We evaluated the physicochemical characterization and the enzymatic profile of the species *Penicillium restrictum* and *Penicillium fellutanum* for production of protease in different culture media. Thus, these enzymes can be considered promising for industrial application.

Key words: Cerrado, *Aspergillus*, *Penicillium*, Proteases, wheat bran.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1.	Proteases	4
2.2.	Fungos filamentosos produtores de proteases	7
2.3.	Aplicação industrial	11
2.4.	Meios de cultivo.....	16
3.	OBJETIVOS.....	19
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1.	Fungos filamentosos estudados	20
	Espécies	20
4.2.	Preparação do inóculo.....	21
4.3.	Triagem para atividade de proteases.....	21
4.4.	Preparação dos meios de cultura e condições de fermentação	22
4.5.	Preparo dos resíduos agroindustriais	22
4.6.	Avaliação da produção de proteases dos fungos selecionados	23
4.7.	Teor de Proteína	23
4.8.	Teor de Glicose	24
4.9.	Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de protease.....	24
4.10.	Efeito do pH sobre a atividade de protease	24

4.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%).....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1. Avaliação da atividade proteolítica em meio sólido	27
5.2. Avaliação da atividade proteolítica.....	27
5.3. Avaliação da atividade proteolítica em diferentes meios líquidos de cultivo .	33
5.4. Avaliação do Perfil das proteases produzidas pelas espécies <i>Penicillium fellutanum</i> e <i>Penicillium restrictum</i>	36
5.5. Perfil proteico nos três meios de cultivo avaliados.....	47
5.6. Avaliação de proteases expressas por fungos filamentosos <i>Penicillium fellutanum</i> e <i>Penicillium restrictum</i> após crescimento nos meios de cultivos 1, 2 e 3.....	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A tecnologia enzimática é atualmente empregada em diversos setores como, por exemplo, nas indústrias têxtil, de papel e celulose, de detergentes e farmacêutica (ANITHA e PALANIVELU, 2013; GHORBEL et al., 2014; HSIAO et al., 2014). Da mesma forma, na indústria de laticínios os procedimentos para a remoção dos depósitos de leite na pasteurização que utilizam produtos químicos não biodegradáveis provocam um impacto negativo sobre o ambiente o que é minimizado com a aplicação enzimática no processo (BOYCE e WALSH, 2012).

As proteases dominam uma parte do mercado mundial de enzima representando um dos grupos mais importantes na aplicação industrial e corresponde pelo menos 60-65% do mercado mundial total de enzima. Em 2010 o mercado mundial de enzimas foi estimado em 3,3 bilhões de dólares podendo chegar em 4,4 bilhões em 2015 (SANATAN et al., 2013).

Os micro-organismos representam uma fonte atraente de proteases uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades, em um período de tempo relativamente curto por meio estabelecido de métodos de fermentação, produzindo uma quantidade abundante e regular do produto desejado. Além disso, as proteínas microbianas podem ser armazenadas em condições menos do que ideal durante semanas sem perda significativa de atividade. Em geral, as proteases microbianas são de natureza extracelular e são diretamente segregadas 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 (GUPTA et al., 2002).

Apesar da extensa lista de micro-organismos produtores de proteases, apenas alguns são considerados adequados produtores para exploração comercial, sendo geralmente considerados como seguros (GRAS), do inglês *generally recognized as safe*, estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA), não-tóxicos e não patogênicos (SALEEMUDDIN e ANWAR, 1998).

A maioria das enzimas microbianas pertencentes a classe das hidrolases produzidas comercialmente são provenientes de bactérias, principalmente as do

gênero *Bacillus* e de fungos (filamentosos e leveduras), com destaque para os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (COLEN, 2006).

Dentre as bactérias que excretam proteases, podemos citar os seguintes gêneros: *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus (vulgaris)*, *Clostridium sp.* e outras anaeróbias. Os fungos filamentosos por sua vez são explorados para a produção de enzimas industriais, devido à sua capacidade de crescimento em substratos sólidos e produção de diferentes enzimas extracelulares (VISHWANATHA et al., 2010). Estes estão distribuídos amplamente na natureza, onde usualmente crescem na superfície de material orgânico. A evolução dos fungos superiores se deu com o seu desenvolvimento em substratos sólidos, nos quais têm baixa quantidade de água disponível (COLEN, 2006).

A literatura relata espécies do gênero *Penicillium* sendo mesofílicas, termofílicas ou ácidos tolerantes, boas produtoras de enzimas extracelulares, tais como lipases, proteases, celulasas e xilanases (LI e ZONG, 2010). Essas espécies produzem principalmente proteases ácidas, termofílicas e termoestáveis (DJAMEL et al., 2009). Essas proteases podem ser neutras, ácidas ou alcalinas. Proteases ácidas com pH entre 4 e 6 são produzidas por *Aspergillus sp.* (CHAUD et al., 2007).

Para serem usadas nas indústrias de alimentos e farmacêutica, as proteases precisam ser estáveis em pH baixo (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000), já nas indústrias de couros e de detergentes as proteases devem ser ativas em pH básico (ZAMBARE et al., 2011).

Proteases com alta atividade e estabilidade em pH e em temperatura altas são importantes para aplicações em biotecnologia e bioengenharia. Em geral, as proteases microbianas são extracelulares, diretamente segregadas pelo produtor no caldo de fermentação simplificando assim as etapas de processos posteriores para obtenção das enzimas, quando se compara com as proteases obtidas de plantas e animais (SAVITHA et al., 2011).

Desta forma, torna-se importante o estudo de novos isolados capazes de produzir enzimas estáveis em uma ampla faixa de pH e temperatura. Neste contexto, encaixa-se o estudo de micro-organismos presentes no solo do Cerrado

Brasileiro, localizado na Região Centro-Oeste, considerando a baixa umidade do solo desta região e a alta temperatura durante grande parte do ano.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteases

O uso prático das enzimas tem sido explorado de forma direta pelo ser humano há milhares de anos, por meio das preparações enzimáticas brutas de origem animal ou vegetal, e de forma indireta aproveita-se a ação enzimática decorrente do crescimento microbiano sobre determinados substratos. A produção e o uso de enzimas microbianas constituem hoje o maior setor da indústria biotecnológica (COLEN, 2006).

As principais enzimas industriais são proteases, carboidrases (amilases, celulasas e xilanases), lipases e fitases. Estão divididas em três segmentos de mercado: enzimas técnicas aplicadas em produtos de limpeza, têxtil, couros, álcool como combustível e papel; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal (SILVA, 2011).

As proteases também denominadas peptidases, são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. A ligação peptídica é a ligação mais importante que une os aminoácidos para formar peptídeos e proteínas. A hidrólise das ligações peptídicas é fundamental para a determinação da composição em aminoácidos das proteínas (LEHNINGER et al., 1995). Segundo Schaller (2004), essas enzimas são essenciais para a síntese de um grande número de proteínas, controlando a composição, o tamanho, a forma, as reações de hidrólise e sua destruição final. A ação das proteases é altamente específica, sendo cada uma responsável pela quebra de determinadas sequências de aminoácidos em um conjunto particular de condições ambientais.

As proteases são divididas de acordo com sua fonte (animal, vegetal, microbiana), sua ação catalítica (exoproteases e endoproteases) ou de acordo com a natureza do seu sítio catalítico (serino, sulfidrílicas, ácidas e metalo) (SILVA, 2011). 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), classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada. Também podem ser classificadas de acordo com a faixa de pH em que

apresentam maior atividade: ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) e alcalinas (pH 8,0-13,0) (RAO et al., 1998; VERMELHO et al., 2008).

Endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, e as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, removendo único aminoácido, dipeptídeo ou tripeptídeo de uma ou outra região terminal. As endopeptidases podem ser ainda subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico-proteínases (EC 3.4.23) e metaloproteínases (EC 3.4.24). As serinas peptidases possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, enquanto as aspártico-proteínases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteínases necessitam de íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO et al., 1998).

As endopeptidases, que também podem ser chamadas de proteínases, têm a sua classificação de acordo com seu poder de catalisação, sendo classificadas de acordo com o resíduo presente no sítio catalítico da enzima. Uma nova classe de proteínases foi descrita recentemente, apresentando glutamato no lugar do ácido aspártico e sendo denominada proteínase-glutâmica (SCHALLER, 2004).

As exopeptidases caracterizam-se por hidrolisarem ligações peptídicas próximas aos terminais carboxílicos (carboxipeptidases) e amina (aminopeptidases) do substrato. As carboxipeptidases podem ser subdivididas em serinoproteases, metaloproteases, cisteínoproteases, peptidil dipeptidases, dipeptidase e omegapeptidases. Já as aminopeptidases compreendem as dipeptidil peptidases e as tripeptidil peptidases. As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC 3.4.99 (GUPTA et al., 2002; RAO et al., 1998; SINGH et al., 2001; VRANOVA et al., 2013).

As endopeptidases são mais específicas que as exopeptidases, pois agem de acordo com seu mecanismo catalítico e sua ação vai depender do tipo de resíduo existente no sítio ativo da enzima. Desta forma, as primeiras proteases a agirem são as endopeptidases, gerando peptídeos menores que serão hidrolisados a aminoácidos livres pela ação múltipla de exopeptidases (CALLIS, 1995).

Quase um terço de todas as proteases pode ser classificadas em serinoproteases e são assim denominadas pela presença do resíduo nucleofílico de serina no sítio ativo, o que é formado por uma “tríade catalítica” representada pelos resíduos Ser195-His57 e Asp102 (a numeração é baseada na posição dos resíduos na quimiotripsina). Algumas das serinoproteases já foram bem estudadas como, por exemplo, a tripsina, a quimiotripsina e a elastase (LOPES, 2006).

De maneira geral, as proteases podem ser extracelulares e intracelulares, ligadas ou não à membrana, as extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para posterior absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares possuem um papel importante na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas são essenciais em vírus, bactérias e parasitas para sua replicação e propagação de doenças infecciosas e também estão presentes em vários tecidos de animais, plantas e micro-organismos (LOPES, 2006). As proteases podem contribuir para patogenicidade causando danos diretos nos tecidos ou aumentando a capacidade de invasão. Estas enzimas possuem um papel crítico em muitos processos fisiológicos e patológicos, como o catabolismo de proteínas, a coagulação do sangue, o crescimento e migração celular, inflamação, diferenciação de tecidos, crescimento de tumores e metástases, liberação de hormônios peptídeos farmacologicamente ativos a partir de proteínas precursoras, ativação de neurotransmissores, bem como transporte e secreção de proteínas através da membrana (RAWLINGS et al., 2007).

As proteases de origem microbiana têm sido muito utilizadas na indústria, sendo oriundas de fungos produtores de proteases, podem ser extraídas e separadas do micélio (DJAMEL et al., 2009). Elas apresentam um pH ótimo na faixa de 3,0 a 12,0 enquanto que a maioria dos micro-organismos isolados do solo que possuem atividade proteolítica o apresentam na faixa de pH igual a 8,0 e 9,0 com a temperatura entre 40-60 °C (VRANOVA et al., 2013).

Na indústria de detergentes o uso das atividades catalíticas das proteases é uma boa escolha, no entanto, a sua aplicação exige que as mesmas mantenham atividade em condições não fisiológicas tais como em altas temperaturas e elevado

pH, agentes quelantes de cálcio e detergentes. A maior parte delas são instáveis ou inativas a essas condições. Além disso, alguns solventes orgânicos podem desestabilizar e diminuir a atividade catalítica da enzima (LI et al., 2012). Enzimas termoestáveis que atuam na faixa de temperatura de 65 a 85 °C exercem importante papel como catalisadores em processos que requerem altas temperaturas como nas indústrias de cerveja e do couro (MERHEB et al., 2007).

Segundo Fleuri et al. (2005), as proteases podem ter sua aplicação na transformação de leveduras para isolamento de produtos de recombinação de DNA, na preparação de protoplastos, na composição e mecanismo da síntese da parede celular, na digestão de polissacarídeos e proteínas da parede celular de leveduras para obtenção de proteínas intracelulares e pigmentos, na obtenção de extrato de levedura, no tratamento de massa celular de levedura residual para ração animal e no tratamento de doenças provocadas por leveduras e fungos.

As principais utilizações das proteases estão na produção biotecnológica de detergentes (pepsina), na indústria de laticínios, como agentes de coagulação do leite, como um agente para o amaciamento da carne, elas também têm aplicação clínica e médica, como por exemplo, na patogênese de doenças cardiovasculares (DJAMEL et al., 2009 ; HUA e NAIR, 2014), aplicação em fórmulas cosméticas com atividade de *peeling* cutâneo (LODS et al., 2000), bem como podem ser alvo para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (BRUCE, 2004).

2.2. Fungos filamentosos produtores de proteases

Os micro-organismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua grande diversidade biológica e susceptibilidade a manipulação genética (AGRAWAL et al., 2005). A maioria dos micro-organismos do solo expressam atividades proteolíticas, com exceção de alguns fungos lignolíticos termotolerantes isolados de florestas e algumas micobactérias e clostrídios (VRANOVA et al., 2013).

As proteases desempenham um importante papel nas interações dos micro-organismos do solo via clivagem das proteínas da parede celular, elas reciclam o

solo orgânico garantindo assim a nutrição microbiana, e sobrevivência do micro-organismo em condições desfavoráveis (VRANOVA et al., 2013).

Fungos podem produzir proteases 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. As proteases ácidas de importância comercial são também de origem fúngica e são todas enzimas extracelulares empregadas nas indústrias de alimentos: na produção de alimentos fermentados de soja, para a modificação de proteínas do trigo em massas de pão (ALEKSIEVA e PEEVA, 2000).

Em relação às proteases alcalinas encontram aplicações industriais como ingrediente ativo de detergentes para a roupa (SAVITHA et al., 2011), na fábrica de curtumes, de alimentos, na indústria química entre outras (KUMAR e TAKAGI, 1999). Vários gêneros de micro-organismos tais como *Bacillus*, *Streptomyces* e *Aspergillus* bem como os gêneros *Trichoderma*, *Rhizopus* e *Penicillium* têm sido extensivamente estudados para a produção de proteases alcalinas (AGRAWAL et al., 2005).

Os fungos filamentosos são usados em muitos processos industriais para a produção de enzimas e metabólitos. Alguns desses fungos são produtores de uma série de enzimas fúngicas, como amilases, amiloglicosidases, celulasas, pectinases, lacases, ligninases, fitases, proteases, lipases e glico-oxidases (HOMBERG et al., 1997; WARD, 2011). Fungos filamentosos, tais como do gênero *Aspergillus*, são capazes de crescer em meio de cultura de baixo custo (subprodutos sólidos agroindustriais) e produzir grandes quantidades de enzimas (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

As proteases microbianas de espécies do gênero *Aspergillus* são conhecidas pela sua capacidade de secretar níveis elevados de enzimas no ambiente de crescimento, várias destas enzimas produzidas numa fermentação submersa em grande escala, têm sido amplamente utilizadas na indústria ao longo de décadas. Alguns exemplos de espécies são *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* (KRANTHI et al., 2012; MACCHIONE et al., 2008; MALATHI e CHAKRABORTY, 1991; VISHWANATHA et al., 2010).

No entanto, cinco gêneros de fungos *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria* podem produzir micotoxinas, entre as quais, destacam-se a aflatoxina, ocratoxina, zearalenona, patulina, fumonisina e desoxinivalenol. As micotoxinas são metabólitos secundários, de baixo peso molecular, produzidos por fungos, apresentam efeito tóxico para o homem e outros vertebrados, além de alguns invertebrados, plantas e micro-organismos. No Brasil, as aflatoxinas são as únicas micotoxinas cujos limites máximos em alimentos são previstos na legislação Resolução da Diretoria Colegiada da RDC Nº 7, de 18 de fevereiro de 2011 (MAZIERO e BERSOT, 2010).

Nos Estados Unidos algumas espécies do gênero *Aspergillus* e do gênero *Penicillium* são classificadas como status GRAS por apresentarem baixa toxicidade, característica favorável para a utilização dos mesmos na indústria (GUIMARÃES et al., 2010; VARGAS et al., 2007). No Brasil, a Resolução da Diretoria Colegiada da RDC Nº 26, de 26 de maio de 2009, considerando a CTNBio, no seu Art. 1º aprovou a lista de enzimas permitidas para uso em alimentos destinados ao consumo humano conforme a sua origem. Essa lista apresenta as proteases produzidas por algumas espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Bacillus*, e *Rhizomucor*, além das espécies *Endothia parasítica*, *Lactobacillus casei*, *Micrococcus caseolyticus*, *Mucor pusillus* e *Streptomyces fradiae*.

Foram descritas muitas espécies de fungos utilizadas para produzir as proteases, tais como as de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus*, *Mucor meihi*, *Mucor pusillus*, *Mucor bacilliformis*, *Trichoderma harzianum*, *Verticillium lecanii* e *Fusarium subglutinans*. Assim como as espécies *Penicillium expansum*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium occitanis*, *Penicillium notatum*, *Penicillium verrucosum*, *Penicillium janthinelum*, *Penicillium purpurogenum* e *Penicillium duponti* com um grande potencial biotecnológico para a produção de proteases e outras enzimas (IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2007).

Na natureza as espécies do gênero *Penicillium* são versáteis e oportunistas patógenos de pós-colheita causando comum deterioração em frutas e vegetais. Particularmente, o *Penicillium notatum* é famoso como o produtor do primeiro antibiótico a penicilina, descoberto por Fleming em 1928 (LI e ZONG, 2010).

O fungo *Penicillium restrictum* é um produtor promissor das enzimas hidrolíticas. Quando cultivado em meio sólido de baixo custo composto por resíduos agroindustriais, ele produz um conjunto de hidrolases capazes de degradar o composto orgânico mais complexo como exemplo o óleo e a graxa oriundos de efluentes industriais (ROSA et al., 2006).

De acordo com Tavares et al. (2012), os fungos do gênero *Penicillium* têm sido estudados como vantajosos produtores de proteases. Esses autores isolaram os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* com o objetivo de analisar a produção de protease pelos mesmos. Os dois gêneros apresentaram atividade enzimática. Em relação à produção de protease os *Aspergillus* apresentaram um valor de 1,36 U/mL a 3,38 U/mL, enquanto para os *Penicillium* os valores foram significativamente superiores (10,82 U/mL).

Em 2007, Manivannan e Kathiresan verificaram a produção de protease com atividade igual a 17 U/mL pelo fungo *Penicillium fellutanum* isolado do solo. Similarmente Savitha et al. (2011) verificaram a produção de proteases com atividades específicas iguais a 14,85 IU/mg e 14,50 IU/mg respectivamente pelos fungos *Ghaphium putresis* e *Trichoderma harzianum* isolados de uma amostra de efluente recolhida da indústria de sagu.

Um requisito importante para a comercialização de enzimas é a estabilidade térmica devido à facilidade de desnaturação térmica e inativação. Por isso, o crescente interesse em proteases termoestáveis. A maioria das pesquisas tem sido feitas sobre a purificação e caracterização de proteases a partir de bactérias termófilas dos gêneros *Bacillus*, *Sulfolobus*, *Pyrococcus*, *Thermoanaerobacter*, *Fervidobacterium* e *Geobacillus* e fungos termofílicos dos gêneros *Thermomyces*, *Scytalidium*, *Paecilomyces* e *Aspergillus* (LI et al., 2012).

De acordo com Said e Pietro (2002), as proteases produzidas por micro-organismos têm importante interesse industrial por apresentarem especificidades a diferentes substratos. Desta forma, torna-se de grande utilidade em áreas bioquímicas e biotecnológicas, incluindo as indústrias alimentícias, têxteis e de medicamentos sua investigação.

2.3. Aplicação industrial

2.3.1. Proteases aplicadas na produção de detergentes

A utilização de proteases na indústria de detergentes tem sido bastante abrangente, devido sua característica eficiente na capacidade de remoção de manchas de forma uniforme quando comparado a tecnologia dos detergentes convencionais (GUPTA et al., 2002). A indústria de detergentes surgiu como grande consumidor de diversas enzimas hidrolíticas, o uso de proteases no preparo de detergentes responde pelo maior emprego comercial de proteases (RAVAL et al., 2014; SILVA, 2011).

De acordo com Chaud et al. (2007), a protease para ser aplicada na utilização de detergente precisa ter a especificidade em remoção com facilidade de uma grande variedade de manchas de alimento, sangue, e outras secreções do corpo. Os pré-requisitos principais para o uso de proteases em detergentes são valores altos de pH (8-12) e estáveis em temperaturas entre 50 e 70 °C e compatibilidade com outros agentes quelantes e oxidantes (GUPTA et. al., 2002).

O parâmetro chave para o melhor desempenho de uma protease em um detergente é seu ponto isoelétrico, pois quanto mais próximo este for em relação ao pH da solução detergente, mais apropriada ela será para esta aplicação (RAO et al., 1998). Ponto isoelétrico ou pI , é o valor de pH onde uma molécula, por exemplo, um aminoácido ou uma proteína, apresenta carga elétrica líquida igual a zero. O pI é o pH no qual há equilíbrio entre as cargas negativas e positivas dos grupamentos iônicos de um aminoácido ou de uma proteína. Segundo Gupta et al. (2002), a maioria das proteases alcalinas tem seu ponto isoelétrico próximo ao pH ótimo, em torno de 8-12 e são mais ativas em temperaturas entre 50 e 70 °C.

A origem na utilização de enzimas proteolíticas em detergentes foi por volta de 1914. Nesta época foi produzido o primeiro detergente enzimático que consistia de carbonato de sódio adicionado de extrato com enzimas pancreáticas. No entanto, foi somente em 1956 que surgiu o primeiro detergente com enzimas microbianas cujo nome foi Bio-40[®] contendo a “alcalase”, que é uma protease alcalina (GUPTA et al., 2002).

Em 2014, Ghorbel et al. isolaram e caracterizaram proteases da bactéria *Streptomyces flavogriseus* HS1 com atividade ótima em pH 7,0, a 50 °C e estável a agentes oxidantes podendo ser utilizadas como aditivos em detergentes.

Boyce e Walsh (2012) realizaram um estudo com quatorze fungos produtores de proteases com atividade sobre a proteína do leite, e observaram que a protease produzida pelo fungo *Schizophyllum commune* foi a mais adequada para uma potencial aplicação juntamente com as formulações de detergentes de limpeza comerciais.

2.3.2. Proteases aplicadas na indústria de alimentos

O uso de enzimas como agentes de modificação de propriedades funcionais de proteínas tem se tornado bastante difundido na indústria de alimentos (THYS, 2004). As aplicações de proteases na indústria alimentícia estão relacionadas a obtenção de hidrolisados proteicos de forma a melhorar o seu sabor e qualidade (FURTADO et al., 1999).

Além disso, na produção e maturação de queijos, as proteases são empregadas na coagulação do leite por meio da hidrólise da ligação peptídica (Phe 105-Met 106). Entre as enzimas mais utilizadas neste processo destacam-se a ação da quimosina (renina) (EC 3.4.21.4) sendo uma das mais preferidas, devido à sua alta especificidade pela caseína (SILVA, 2011), e podemos citar as produzidas por *Penicillium roqueforti* (FURTADO et al., 1999).

Dini (2010) isolou e purificou uma protease aspártica produzida pelo fungo *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 utilizando farelo de trigo no processo fermentativo. A enzima purificada apresentou baixa ação hidrolítica sobre as caseínas do leite e o queijo tipo Prato produzido com o coagulante do fungo apresentou composição característica deste tipo de queijo. Esse estudo sugeriu que a protease do *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 matura o queijo tipo Prato da mesma forma que o coagulante comercial.

Na panificação, as enzimas proteolíticas podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas, como por exemplo, proteases de *Aspergillus oryzae* cuja ação sobre o glúten da farinha de trigo afeta a elasticidade e a textura, além de contribuir para redução do tempo de mistura da massa e no custo da produção (SILVA, 2011).

As proteases ácidas podem ser utilizadas como temperos, na fermentação de molhos de soja e como auxiliares digestivos. Vishwanatha et al. (2010) otimizaram os parâmetros do processo de fermentação em estado sólido tais como pH, temperatura e tempo de fermentação, utilizando a metodologia de superfície de resposta para demonstrar que estes fatores influenciam no rendimento da enzima desejada. Além disso, eles verificaram que a protease ácida de peso molecular de 47 kDa produzida pelo *Aspergillus oryzae* MTCC 5341 apresentou valores ótimos de pH 5,4, temperatura de 31 °C, atividade proteolítica igual a $8,4 \times 10^5$ U/g de farelo de trigo com um rendimento de 94,8% .

Segundo Evangelista et al. (2001) as proteases são utilizadas no processamento de carnes podendo ser usadas para amaciá-las. As proteases podem ser aplicadas pela forma de imersão, pulverização, adicionadas a condimentos ou por injeção direta em animais vivos ou logo após o seu abate. Estas enzimas também podem ser utilizadas na limpeza de ossos para facilitar a separação mecânica da carne.

Segundo estudos realizados por Kumar e Takagi (1999), proteases produzidas por *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* estão sendo utilizadas na extração de óleos de algumas sementes. Estes estudos relataram que a utilização das enzimas produzidas por *Bacillus licheniformis* aumenta o rendimento de extração em 16%, enquanto a enzima produzida por *Bacillus subtilis* promoveu um aumento de 60% e a protease produzida por *Aspergillus niger* conferiu um aumento ainda maior, da ordem de 90%.

Hsiao et al. (2014) utilizaram caseína como substrato e purificaram uma protease aspártica do fungo *Rhizopus oryzae*. A enzima apresentou valores ótimos de temperatura igual a 75 °C, pH 3,4 e foi estável por 1 hora a 35 °C, com peso molecular estimado em 39 kDa.

2.3.3. Proteases aplicadas na indústria farmacêutica e de cosméticos

Na tecnologia de fermentação tradicional os fungos filamentosos são produtores de uma gama de metabolitos primários, incluindo ácidos orgânicos, tais como ácido cítrico, glucônico, fumárico, ácido kójico itacônico e de ácidos graxos. Eles também produzem importantes agentes terapêuticos humanos, por exemplo, penicilina, cefalosporina, alcalóides, griseofulvina, lovastatina, taxol e zeranol (WARD, 2011).

Em aplicações terapêuticas, na preparação de formas farmacêuticas de liberação lenta, as colagenases, importantes metaloproteases, com atividade proteolítica alcalina são cada vez mais utilizadas. A administração oral de proteases tem sido utilizada para corrigir certas síndromes de deficiência de enzimas líticas (CHAUD et al., 2007).

A protease alcalina produzida por *Aspergillus niger* LCF9 hidrolizou vários tipos de colágeno com a liberação de peptídeos de baixo peso molecular e potencial uso terapêutico (KUMAR e TAKAGI, 1999). Das proteases terapêuticas existentes atualmente no mercado, a maior parte são do tipo serina (LI et al., 2012). As serino proteases estão envolvidas nos processos de coagulação sanguínea e fibrinólise, como também têm um importante papel na homeostase epidérmica (OVAERE et al., 2009).

Outras aplicações de proteases foram evidenciadas nas pesquisas com *Bacillus licheniformis*, bactéria produtora de proteases, a possibilidade de substituição de antibióticos por probióticos cujos resultados destas pesquisas revelaram que o uso desta bactéria como probiótico, adicionada em rações de frangos de corte, resultou em melhor ganho de peso em relação ao grupo controle (CHAUD et al., 2007).

Na indústria de cosméticos as proteases que hidrolisam ligações peptídicas do colágeno e queratina da pele são de grande importância. As proteases como a papaína e bromelina são utilizadas na realização de *peeling* e alisamento da pele, removendo as células mortas, proporcionando a pele um aspecto mais jovem (FREITAS, 2013; LODS et al., 2000). As proteases que apresentam atividade

proteolítica sobre colágeno, queratina e elastina, são empregadas em alguns processos da indústria de cosméticos, tais como cremes esfoliantes e pomadas (SILVA, 2011).

Segundo Ovaere et al. (2009) a formação de uma epiderme normal requer a correta interação de inúmeros processos e fatores. Nos aspectos biológicos da pele as serino proteases são essenciais na construção da barreira lipídica e descamação.

2.3.4. Proteases na indústria de couros

Para a depilação de couros e pele é comumente empregado o método de cal-sulfeto que é ambientalmente questionável, pois o sulfeto além de tóxico tem um odor desagradável. Quando o sulfeto é liberado nos esgotos o acúmulo de gases de sulfetos nos tubos provoca corrosão e liberação de gases venenosos. Por isso a depilação enzimática tem sido amplamente aceita como uma alternativa para o processo químico (GIONGO, 2006). As enzimas usadas no processo de depilação de couros são geralmente peptidases, no entanto nem todas podem ser utilizadas por causa da degradação do colágeno que pode danificar a estrutura e assim diminuir a qualidade do couro (RIFFEL, 2006).

Atualmente as proteases alcalinas microbianas, são usadas no tratamento do couro animal para remover restos de pêlos ou facilitar a embebição com água, conforme as patentes que padronizaram o tratamento de couros com essas enzimas (CHAUD et al., 2007). Também são utilizadas na degradação de proteínas fibrosas animais, como penas, chifres, cabelos e unhas. Essa ação enzimática pode gerar biomassa útil a partir a partir da hidrólise da queratina disponibilizando aminoácidos e peptídeos que podem ser utilizados como aditivos proteicos em ração animal (SILVA, 2011).

Anitha e Palanivelu (2013) purificaram e caracterizaram uma protease queratinolítica do fungo *Aspergillus parasiticus* com pH ótimo 7,0, temperatura ótima de 50 °C, atividade proteolítica igual a 87,110 U/mL, e peso molecular estimado de 36 kDa. Essa enzima pode ser utilizada no tratamento de águas residuais, no

processamento do couro e na indústria de cosméticos para o tratamento da acne e psoríase.

2.4. Meios de cultivo

Diversos fatores ambientais e as respostas a estes fatores influenciam, consideravelmente, na produção de proteases pelos fungos filamentosos. Para uma determinada cepa um determinado fator pode estimular a produção desta enzima, enquanto que para outras, a produção pode ser inibida (RODARTE, 2005).

A produção de protease extracelular em micro-organismos é influenciada por componentes do meio de cultivo, especialmente as fontes de carbono, os fatores físicos, tais como temperatura, pH, densidade do inóculo, oxigênio dissolvido e tempo de incubação (RAO et al., 1998). O metabolismo dos fungos é claramente influenciado pelas concentrações e origens das fontes de carbono, pois elas regulam a expressão de genes envolvidos em várias vias metabólicas, especialmente os envolvidos na utilização e transporte de nutrientes (ROSA et al., 2006).

No entanto a produção destas enzimas é limitada aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que cerca de 30 a 40% do custo envolvido na produção de proteases seja devido ao meio de cultura utilizado (JOO e CHANG, 2005) por isso, grandes quantidades de resíduos gerados a partir das diversas atividades econômicas, agrícolas e agroindustrial são geralmente utilizados como fonte de carbono (CORRÊA, 2009). Na produção de enzimas a relação C/N regula a expressão de proteases e a variação desta razão pode ser alterada bem como a natureza e a concentração dos substratos, pH, temperatura e tempo de incubação (VISHWANATHA et al., 2010).

O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção. Eles têm a característica de servir de matriz sólida e fornecer carbono e fontes de energia para o crescimento dos micro-organismos (DE PARIS, 2008).

Alguns produtos e subprodutos tais como farelo de milho, farelo de trigo, farelo de soja, polpa de côco, polpa de café, resíduo da indústria do vinho, farelo de arroz, batata e bagaço de cana-de-açúcar são comumente empregados na produção de enzimas (DE PARIS, 2008). Em 2007, Nascimento et al. substituíram o nitrato de amônio pelo soro de queijo e o citrato trissódico por água de maceração de milho no meio de cultivo, e verificaram um aumento da atividade proteolítica de 25 U/mg para 59,5 U/mg da produção por *Bacillus* sp. SMIA-2.

O farelo de trigo apresenta em sua composição 18% de proteínas além de sua porosidade que facilitam a dispersão micelial. O trigo é uma boa fonte de metabólitos secundários como ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, fitosteróis, tocoferóis, tocotrienóis e fibras alimentares (SINGH et al., 2001). Silva (2011) utilizou o farelo de trigo sem suplementação proteica e verificou melhor desempenho da produção de protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius, corroborando com outros estudos desenvolvidos por Macchione et al. (2008) os quais demonstraram que o farelo de trigo foi o melhor resíduo agroindustrial para a produção de proteases de diferentes fungos utilizados.

Ravikumar et al. (2012), por meio de uma fermentação em estado sólido utilizaram farelo de trigo, farinha de milho, farelo de arroz para a produção e parcial caracterização da protease do cogumelo medicinal *Pleurotus sajor-caju*. A máxima produção enzimática igual a 31,2 U/mL foi observada em pH 7,0, temperatura ótima de 30 °C, com o substrato farinha de milho a 3% e o peso molecular estimado da protease foi 48 kDa. Merheb et al. (2007) verificaram os valores ótimos de pH igual a 5,5, temperatura 60 °C e atividade proteolítica de 200 U/mL para a protease produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, eles utilizaram também farelo de trigo no meio de cultivo.

Segundo Siqueira (2010), os resíduos agrícolas e agroindustriais, bagaço de cana, engaço de bananeira, resíduos de milho e soja podem ser utilizados como fontes de carbono para a otimização da produção enzimática. A análise bromatológica desses resíduos revelou que: as amostras de engaço de bananeira apresentaram valores significativos de cinzas, proteína total e lignina, já os resíduos de cana-de-açúcar (bagaço e palha) e os da colheita de milho possuíam menores

valores percentuais de proteína total. O engaço de bananeira teve valores mais significativos para os teores de gordura e maior percentual de lignina e carboidratos.

Stenzel (2007) descreveu a composição da soja convencional com proteínas, lipídeos, carboidratos, minerais, poucas vitaminas e fibras contidas quase totalmente na casca.

Considerando as informações existentes na literatura, existe um grande interesse em estudar a produção de proteases utilizando resíduos agroindustriais, pois, são substratos de baixo custo podendo otimizar a produção enzimática para aplicação industrial.

3. OBJETIVOS

Geral: A caracterização do perfil de proteases expressas por fungos filamentosos isolados de diferentes amostras do solo do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro, visando à aplicação industrial.

Específicos:

- Realizar triagem de fungos isolados do Cerrado quanto à produção de protease;
- Avaliar diferentes condições de cultivo dos fungos produtores de protease;
- Caracterizar o perfil físico-químico das enzimas proteolíticas expressas extracelularmente por estes fungos quanto às condições de cultivo;
- Avaliar o comportamento das enzimas proteolíticas frente a inibidores específicos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fungos filamentosos estudados

Foram estudadas 17 espécies diferentes de fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado da Região do Centro-Oeste Brasileiro, pertencentes ao banco de micro-organismo do Laboratório de Enzimologia do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília (UnB) que foram gentilmente cedidas pelo professor Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, coordenador do Laboratório de Enzimologia e colaborador deste projeto. Através desta colaboração, este trabalho de pesquisa possuiu autorização para acessar o patrimônio genético nacional dentro da rede SISBIOTA com o número 010770/2013-5.

As espécies utilizadas para avaliação da produção de protease encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1. Fungos filamentosos isolados do Cerrado e selecionados para este trabalho

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

4.2. Preparação do inóculo

Os fungos previamente armazenados em glicerol a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram reativados em placas de Petri contendo ágar batata dextrose (BDA), e incubados a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 7 dias até o completo crescimento. Em 200 mL de meio de cultura líquido (3% caldo Sabouraud, 2% peptona e 2% leite desnatado) previamente esterilizado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos foram introduzidos 20 discos de 8 mm de diâmetro de ágar micélio obtidos do cultivo em meio sólido. Os frascos de Erlenmeyer de 1000 mL foram incubados por 7 dias em estufa a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. O micélio obtido do cultivo em meio líquido foi filtrado em funil de Buchner estéril e lavado com 300 ml de água previamente esterilizada. Para calcular a quantidade de micélio na suspensão, foi feita a determinação da massa seca do fungo (g/mL) presente numa alíquota dessa suspensão. Para determinar a massa seca filtrou-se em papel de filtro, anteriormente seco e tarado, 25 mL da suspensão. O filtrado, juntamente com o papel, foi seco em estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ até atingir peso constante.

4.3. Triagem para atividade de proteases

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

4.4. Preparação dos meios de cultura e condições de fermentação

Os meios de cultivo escolhidos para a produção de proteases foram divididos em três grupos e suas composições estão descritas na Tabela 2. Os meios de cultivo mencionados foram preparados utilizando água destilada como diluente e, em seguida, foram submetidos à esterilização em autoclave a 120 °C por 40 minutos. Uma vez preparados os mesmos foram inoculados com 5 mL de pré-inóculo. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 30 mL do meio, em estufa com agitação (*shaker*) a 150 rpm, à temperatura de 28 °C por 7 dias. Os experimentos realizados em estufa sem agitação foram mantidos também à temperatura de 28 °C por 7 dias.

Tabela 2. Composição dos meios de cultivos utilizados para a produção de proteases extracelulares em erlenmeyers.

Meios de cultivo	Composição
Meio 1	3% caldo Sabouraud, 2% peptona e 2% leite desnatado.
Meio 2	3% caldo Sabouraud, 2% peptona, 2% de extrato de levedura e 1% de caseína hidrolisada.
Meio 3	1% de farelo de trigo e 0,4% de extrato de levedura; 0,4% de peptona; 0,2% de fosfato de potássio; 0,8% de fosfato de sódio e 0,25% de sulfato de magnésio.

4.5. Preparo dos resíduos agroindustriais

A metodologia para o preparo dos resíduos agroindustriais casca de soja, resíduo de soja e engaço de bananeira utilizados neste trabalho foi realizada segundo Siqueira (2010). Os tratamentos dos resíduos agroindustriais utilizados foram feitos no Laboratório de Produtos Vegetais, no Departamento de Ciência dos Alimentos e no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química, ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

4.6. Avaliação da produção de proteases dos fungos selecionados

Para medida da atividade proteolítica foi utilizada a metodologia proposta por (CHARNEY e TOMARELLI, 1947), utilizando azocaseína como substrato. A reação foi iniciada por incubação de 500 µL do filtrado do cultivo a 37 °C, na presença de 500 µL de azocaseína a 0,5% (m/v) em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0, sendo interrompida após 40 minutos pela adição de 500 µL de ácido tricloroacético 10% (m/v) para precipitação da caseína não hidrolisada. Após centrifugação a 14000 rpm por 10 min a 4 °C , e 1 mL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo ao qual se adicionou 1,0 mL de KOH 5,0 M. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no tubo teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1800) a 430 nm.

O branco da reação foi feito com 500 µL de tampão em substituição ao extrato enzimático. Este branco foi utilizado como solução de referência para zerar o espectrofotômetro. Além disso, para cada amostra foi feito um branco adicionando-se TCA antes da adição do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,001/min UI/mL. Os testes foram realizados em triplicata e como controle positivo foi utilizada uma solução de tripsina (Merck) a 0,001%.

4.7. Teor de Proteína

O teor de proteínas foi determinado como descrito por Bradford (1976). 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 padrão utilizou-se albumina de soro bovino (5-200 µg/mL). O reagente foi preparado pela dissolução de 100 mg de azul de Comassie G-250 em uma mistura de 100 mL de ácido fosfórico a 85% e 50 mL de metanol a 95%. Depois de completa dissolução do corante, adicionou-se água até completar o volume para 1 litro.

4.8. Teor de Glicose

O teor de glicose foi determinado pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) de Miller (1959), utilizado para quantificar açúcares redutores. Solução de glicose foi utilizada como padrão.

4.9. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade de protease

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinada incubando-se a mistura da reação em temperaturas que variaram de 30-75 °C por 40 minutos em pH 5,0. Após 40 minutos de reação em cada temperatura a atividade enzimática foi determinada. A estabilidade térmica das enzimas presentes no extrato bruto foi verificada na temperatura ótima para cada espécie dos fungos selecionados, incubando-se as enzimas por períodos de 1 a 6 horas em pH ótimos. Após esse tratamento, as atividades proteolíticas residuais foram analisadas conforme descrito no item 4.6.

4.10. Efeito do pH sobre a atividade de protease

O pH ótimo da enzima protease presente no extrato foi determinado utilizando tampão citrato-fosfato 50 mM (pH 5,0 - 6,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0-8,0) e tampão tris (pH 9,0). As atividades enzimáticas foram avaliadas conforme descrito no item 4.6.

4.11. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%)

As eletroforeses sob condições desnaturantes foram realizadas em gel de poliacrilamida de duas fases de diferentes porosidades e valores de pH na presença de SDS (dodecil sulfato de sódio) (LAEMMLI, 1970).

4.11.1. Preparo das amostras

As amostras foram precipitadas através da adição de solução de ácido tricloroacético (TCA 75%) e 1,0 mL de acetona (v/v) para 1,0 mL de amostra. A mistura foi mantida sob refrigeração durante aproximadamente 30 minutos, em seguida centrifugada (14000 rpm x 15 minutos). O *pellet* resultante foi ressuspensão em acetona e centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos. Esse processo foi repetido diversas vezes a fim de remover diversas impurezas e concentrar a amostra.

Após a última centrifugação e descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensão com 10 µL de tampão de amostra. O tampão da amostra foi preparado com 1 mL de tampão Tris-HCl (500 mM; pH 7,0); 0,8 mL de glicerol (20%); 1,6 mL de solução de SDS (4%); 0,4 mL de β-mercaptoetanol; 0,4 mL de azul de bromofenol (0,01%); e 3,8 mL de água destilada. Essa solução foi incubada a 100°C por 5 minutos, resfriada e a seguir aplicada em gel de poliacrilamida 12%.

4.11.2. Preparo dos géis

Os géis de poliacrilamida são formados por copolimerização de acrilamida e Bis-acrilamida (Bis) na presença de persulfato de amônio e tetrametiletenodiamina (TEMED). Os componentes acrílicos são preparados segundo Laemmli (1970) em duas fases, chamada de sistema descontínuo que consiste de géis, concentrador e separador. O tampão Tris-HCl 25 mM contendo glicina 0,18% p/v e SDS (dodecil sulfato de sódio) 0,1% p/v, foi utilizado como tampão de corrida.

4.11.3. Coloração dos géis de poliacrilamida para bandas proteicas

Após o término da eletroforese (SDS-PAGE) em aparelho EPS 301 Mini VE da GE Healthcare Life Sciences, a presença das bandas proteicas foram reveladas aplicando uma coloração de nitrato de prata. O gel foi incubado por 30 minutos em uma solução contendo 100 mL de etanol (99,8%), 25 mL de ácido acético glacial e água destilada em quantidade suficiente para completar 250 mL de solução. Em seguida o gel foi mantido por 30 minutos em outra solução contendo 75 mL de etanol

(99%), 1,25 mL de glutaraldeído (25%), 10 mL de tiosulfato de sódio (5%), 17 g de acetato de sódio e água destilada em quantidade suficiente para completar 250 mL de solução. O gel foi lavado por 3 vezes, cada lavagem de 15 minutos. Após a lavagem o gel foi incubado e permaneceu ao abrigo da luz por 15 minutos, em outra solução contendo 25 mL de nitrato de prata (2,5%), 0,1 mL de formaldeído (37%) e água destilada completando o volume final de 250 mL.

O gel foi lavado com água destilada e adicionado a uma solução contendo 6,25 g de carbonato de sódio anidro, 0,05 mL de formaldeído e água destilada até completar o volume de 250 mL, até o aparecimento das bandas proteicas impregnadas por nitrato de prata. A reação foi interrompida com uma solução que continha 3,25 g de EDTA em 250 mL de água destilada.

4.11.4. Zimograma para atividade proteolítica

O zimograma foi desenvolvido em gel de poliacrilamida contendo 1 mg/mL de gelatina (Sigma-aldrich) que foi copolimerizada ao gel. As amostras foram diluídas no tampão da amostra exceto a adição de agente redutor e desnaturação por calor. Segundo Laemmli (1970), após a corrida da eletroforese, o gel foi incubado numa solução Triton X- 100 2% por 1 hora. Após, o gel foi colocado no Tampão Tris HCl 50 mM contendo CaCl_2 10 mM pH 7,4 durante 12, 6, e 5 horas. Em seguida o gel foi fixado com metanol 50% contendo 10% de ácido acético glacial e corado com Comassie Blue.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da atividade proteolítica em meio sólido

Primeiramente foram avaliadas em placas de Petri dezessete cepas de fungos isoladas do Cerrado Brasileiro, região Centro-Oeste. Nesta análise qualitativa, oito espécies de fungos apresentaram a formação de halo claro ao redor das colônias em placas de Petri após 24, 48 e 72 horas. A formação de halo claro ao redor das colônias produtoras de proteases ocorre devido à hidrólise da caseína do leite presente no meio preparado e solidificado em placas. Esta metodologia é bem estabelecida na literatura e apresentou resultados norteadores para o trabalho. Outros autores como Almeida et al. (2001), também obtiveram halos semelhantes de hidrólise proteica em meio solidificado.

Várias pesquisas sobre produção enzimática por micro-organismos têm sido realizadas, observando que muitos deles têm a capacidade de degradar substratos e produzir enzimas. Um estudo realizado por Alves et al. (2002), testaram a produção de proteases por algumas espécies de *Mucor* sp, que foram cultivados em meio sólido, com a formação de halos que variaram de 3,0 a 6,4 cm.

5.2. Avaliação da atividade proteolítica

5.2.1. Cultivo em estufa sem agitação

As oito espécies selecionadas pela formação de halo claro em meio contendo caseína, foram cultivadas em estufa sem agitação no meio líquido 1 durante 7 dias à 28 °C. Seis espécies apresentaram maiores atividades proteolíticas (Tabela 3). Em seguida, essas espécies foram cultivadas com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias no meio 1, essa avaliação será apresentada no item 5.2.2.

Tabela 3. Atividades proteolíticas após cultivo em estufa sem agitação a 28 °C, 7 dias no meio 1 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona e 2% leite desnatado)

Espécies	Atividade proteolítica (UI/mL)
<i>Aspergillus foetidus</i>	8,27
<i>Fusarium solani</i>	3,87
<i>Paecylomices variotti</i>	6,5
<i>Penicillium citrinum</i>	10,82
<i>Penicillium fellutanum</i>	3,05
<i>Penicillium restrictum</i>	44,87

Djamel et al. (2009) substituíram a farinha de soja pelo leite desnatado durante 10 dias a 32 °C para selecionar as 10 linhagens de *Penicillium* dentre as 253 linhagens isoladas de tecidos em decomposição do molusco *Ruditapes decussatus*. Eles verificaram que as linhagens foram capazes de induzir a produção de protease semelhante à da caseína. Ao final dos estudos a estirpe mutante derivada da cepa S08 apresentou atividade de protease ácida igual a 1400 UI/ml (pH 3,0).

Souza et al. (2008) também utilizaram leite desnatado para a produção de proteases. O trabalho teve como objetivo a produção de enzimas por *Basidiomycotas* da Amazônia. Os fungos foram cultivados em meio líquido, com pH ajustado para cada enzima com temperatura a 28 °C durante 24 horas. Todos os fungos isolados para o experimento foram capazes de produzir proteases.

5.2.2. Cultivo em incubadora com agitação (*shaker*) em meio líquido contendo o meio1 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona e 2% leite desnatado)

Considerando a dificuldade de transferência de oxigênio existente no cultivo estacionário avaliado anteriormente, foi realizado um cultivo sob condições de agitação com as seis espécies fúngicas que expressaram atividades de protease.

Essas espécies foram incubadas sob agitação 150 rpm, durante 7 dias à 28 °C, contendo o mesmo meio de cultivo 1 utilizado na triagem anterior.

Um aumento nas atividades de protease para as espécies *Aspergillus foetidus* (12,91 UI/mL), *Paecylomyces variotti* (8,88 UI/mL) e *P. fellutanum* (19,55 UI/mL) foi obtido nesta nova condição. Entretanto, as espécies *Fusarium solani* (2,15 UI/mL), *P. citrinum* (0,56 UI/mL), e *P. restrictum* (6,30 UI/mL) apresentaram uma diminuição na atividade de protease quando incubadas sob agitação (Figura 1).

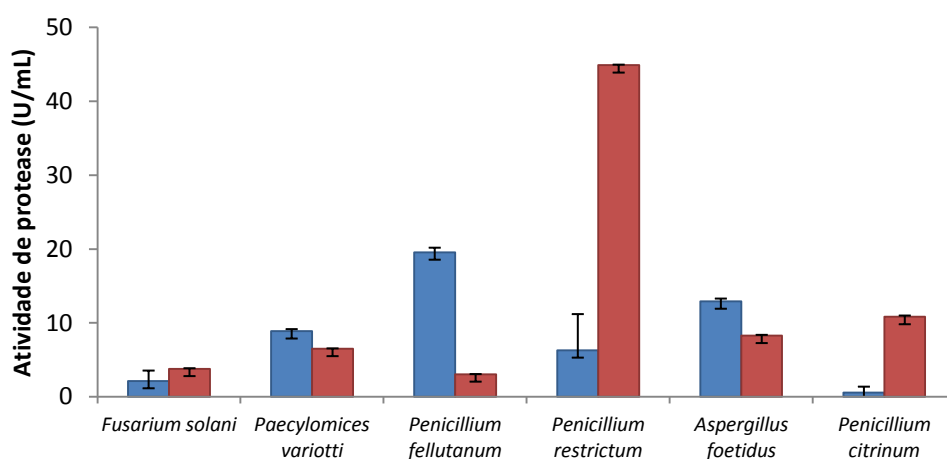


Figura 1. Atividade de proteases expressas por fungos filamentosos avaliados após crescimento em estufa com agitação (azul) e sem agitação (vermelho) a 28 °C por 7 dias.

No decorrer do cultivo, ácidos e bases são liberadas no meio, oriundos de aminoácidos e compostos presentes no meio metabolizados pelos fungos. Estes metabólitos ou compostos de degradação alteram o pH do meio de cultivo, levando-o a valores de pH finais básicos e ácidos. Isto ocorre quando o fungo utiliza os nutrientes do meio de cultura. Ao utilizar esses aminoácidos, os micro-organismos liberam os metabólitos relacionados que será mais ácido ou mais básico que a molécula original, o que dependerá dos micro-organismos e do aminoácido que foi metabolizado.

Na literatura foi encontrado o efeito do pH na fase inicial do cultivo. Segundo Colen (2006) o metabolismo do fungo, ao crescer, altera o pH, seja pela absorção de

ânion ou cátion ou pela produção de ácidos orgânicos ou amônia. Durante o cultivo, o tamponamento é difícil, pois os próprios tampões podem ser assimilados ou podem ser tóxicos em quantidades que seriam necessárias para efetivo tamponamento. Apenas em fermentadores biorreatores, o pH pode ser mantido constante durante o crescimento do fungo.

Gupta et al. (2002) verificaram que alguns íons aumentam a estabilidade enzimática. Esses metais protegem as enzimas contra a desnaturação térmica, possuindo um papel vital na manutenção de sua atividade catalítica.

Avaliando estas alterações de pH ocasionadas durante o cultivo, a Tabela 4 reporta os resultados mostrando que o pH final do meio de cultivo também é influenciado pela agitação ou não do processo. Com exceção do pH final do meio contendo *P. fellutanum*, todos os outros valores de pH final do meio aumentaram com a agitação do processo.

Tabela 4. Valores de pH final do meio de cultivo 1 em estufa com e sem agitação a 28 °C após 7 dias

Fungos	pH do final do meio de cultivo sem agitação	pH do final do meio de cultivo com agitação
<i>Aspergillus foetidus</i>	4,6	5,0
<i>Fusarium solani</i>	3,3	4,0
<i>Paecylomices variotti</i>	3,1	8,2
<i>Penicillium citrinum</i>	5,8	9,0
<i>Penicillium fellutanum</i>	5,5	3,0
<i>Penicillium restrictum</i>	5,4	8,9

A agitação do processo é extremamente importante, objetivando o aumento adequado de oxigênio para que haja condições adequadas para a fermentação. A agitação muitas vezes pode beneficiar a homogeneidade durante a fermentação, promovendo o crescimento, expondo as partículas do substrato à atmosfera e ajudando na transferência de calor e gás. No entanto, em alguns processos, não se pode aplicar alta agitação, pois danifica o micélio do fungo.

A literatura relata a produção de proteases ácidas e alcalinas pelo gênero *Penicillium*. Os resultados obtidos nesse trabalho confirmaram a produção de

proteases pelas espécies *P. fellutanum*, *P. citrinum* e *P. restrictum*. Sendo que sob agitação a espécie *P. fellutanum* apresentou maior atividade proteolítica e o valor do pH final do meio foi igual a 3,0, enquanto que a espécie *P. restrictum* aumentou o pH final do meio para 8,9, com uma atividade proteolítica ainda comparável com as atividades proteolíticas descritas na literatura, desta forma estas duas espécies foram selecionadas para continuarmos com a avaliação do perfil de proteases extracelulares produzidas por cepas de espécies do gênero *Penicillium* isoladas do solo do Cerrado Brasileiro região Centro-Oeste (Figura 2).

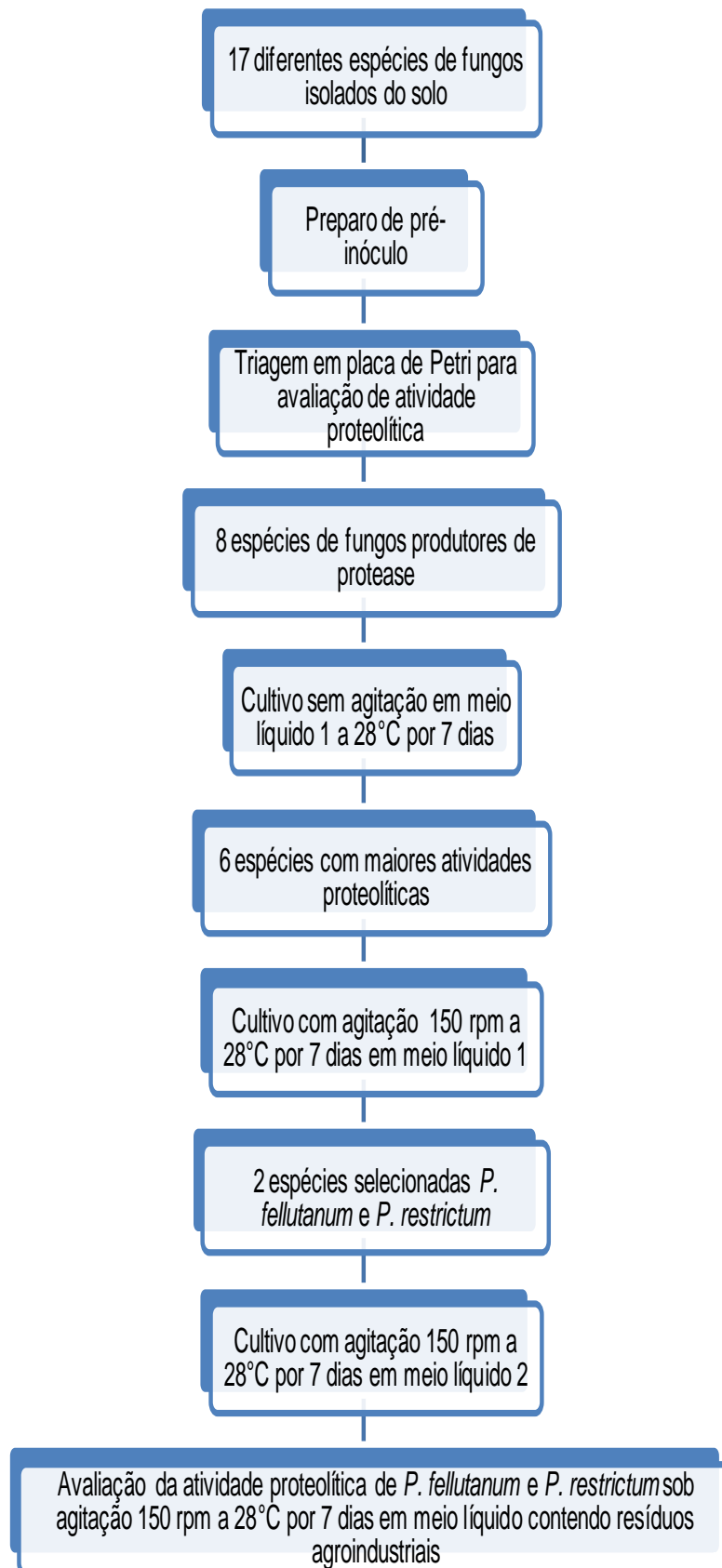


Figura 2. Organograma geral dos fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado utilizados nesse trabalho.

5.3. Avaliação da atividade proteolítica em diferentes meios líquidos de cultivo

5.3.1. Avaliação da atividade proteolítica em meio líquido contendo meio 2 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona, 2% de extrato de levedura e 1% de caseína hidrolisada)

Para avaliação da atividade proteolítica em diferentes meios de cultivo, as espécies dos fungos filamentosos *P. fellutanum* e *P. restrictum* foram cultivadas no meio 2 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona, 2% de extrato de levedura e 1% de caseína hidrolisada) sob agitação 150 rpm a 28 °C por 7 dias. Um incremento na atividade de protease foi obtido para a espécie *P. restrictum*, enquanto no caldo fermentado pelo fungo *P. fellutanum* foi detectada uma menor concentração enzimática para proteases (Tabela 5).

No meio de cultivo 2, o fungo *P. fellutanum* elevou o pH final do meio para 9,0 e inversamente o *P. restrictum* abaixou o pH do meio de cultivo para a faixa próxima a neutralidade quando comparado ao meio 1 (Tabela 5). Condições de cultivo são essenciais para o sucesso da produção de enzimas, por isso parâmetros como pH, temperatura e composição do meio devem ser controlados no desenvolvimento dos processos (ABIDI et al., 2011).

Tabela 5. Comparativo das atividades proteolíticas extracelulares e valores de pH final dos meios de cultivos 1 e 2 em estufa com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.

Fungos	Atividade proteolítica (UI/mL) no meio 1	Atividade proteolítica (UI/mL) no meio 2	pH final no meio 1	pH final no meio 2
<i>Penicillium fellutanum</i>	19,55	10,65	3,0	9,0
<i>Penicillium restrictum</i>	6,30	13,70	8,9	7,6

Como explicaram Gupta et al. (2002), as proteases alcalinas têm grande especificidade de substrato, sendo ativas mediante a um número de substrato sintético e de proteínas naturais. No entanto, estudos mais detalhados relatam que a atividade destas enzimas é bem maior diante da caseína.

Galvao et al. (2013) verificaram a produção de protease por *Penicillium* e *Aspergillus*. Foram utilizados 25 g de cada amostra do solo suspensa em 225 mL de água destilada esterilizada e o sistema foi agitado durante três minutos. Os autores observaram que o gênero *Penicillium* teve bons resultados de produção enzimática, já os do gênero *Aspergillus*, apenas uma espécie degradou a caseína. Este estudo concluiu que a atividade proteolítica pode variar entre indivíduos da mesma espécie e gêneros.

5.3.2. Avaliação da atividade proteolítica em meio líquido contendo resíduos agroindustriais

Foi considerada a utilização de meios de cultivo de baixo custo, pois é de grande interesse industrial, viabilizando muitas vezes a comercialização do produto final. Exploramos a possibilidade de utilizar como fonte de carbono resíduos agroindustriais, tais como, casca de soja, resíduo de soja, engaço de bananeira e farelo de trigo cultivados com agitação a 150 rpm, 28 °C por 7 dias (Figura 3).

Um relevante acréscimo nas atividades de protease para as espécies *P. fellutanum* e *P. restrictum* foram observados no cultivo com casca de soja e farelo de trigo (Figura 3). Foram comparadas as atividades obtidas anteriormente em outros meios de cultivo: para a espécie *P. fellutanum* a atividade proteolítica teve um aumento de 19,55 UI/mL no meio 1 para 71,91 UI/mL no meio 3. Avaliando a espécie *P. restrictum* pode ser observado um aumento de atividade de 13,7 UI/mL no meio 2 para 72,98 UI/mL no meio 3.

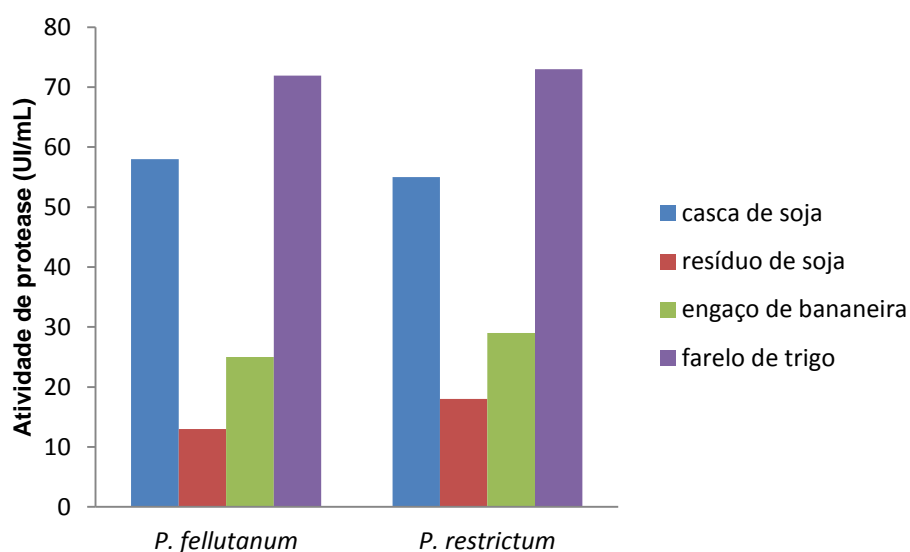


Figura 3. Avaliação de proteases expressas por fungos filamentosos *P. fellutanum* e *P. restrictum* após crescimento em meio líquido contendo resíduos agrícolas com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.

Este resultado corrobora com a literatura onde Silva (2011), evidenciou a produção máxima de proteases com atividade igual a 1300 UI/mL pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius quando utilizou farelo de trigo como substrato. Germano et al. (2003) utilizaram uma torta de soja como fonte de carbono e nitrogênio para uma parcial caracterização de uma serino protease neutra produzida por *Penicillium* sp. em fermentação em estado sólido, obtendo atividade proteolítica da enzima pura ou semi pura igual a 43 UI/mL, menor do que os resultados obtidos com as cepas testadas neste projeto.

Ikram-UL-HAQ e Mukhtar em 2007 utilizaram farelo de girassol, farelo de trigo, casca de arroz e farelo de algodão para sintetizar protease ácida produzida pelo fungo *Penicillium griseoroseum* IH-02, sendo que o farelo de soja foi a melhor fonte com atividade enzimática de 5,6 UI/mL.

Um estudo realizado por Sandhya et al. (2005) analisaram a produção de protease por uma espécie de *Aspergillus* em farelo de trigo, mostrando que houve uma maior produção enzimática quando foi adicionada 43,6% de umidade ao meio, apresentando atividade de 30,5 UI/g. Anandan et al. (2007) avaliaram a produção de protease por *Aspergillus tamarii* em farelo de trigo, obtendo atividade enzimática com 65% de umidade. No entanto, quando aumentada a umidade, esta atividade enzimática diminuiu. Desta forma, estes autores concluíram que o aumento da

umidade do meio limitou a transferência de oxigênio, diminuindo a atividade enzimática. Para Gupta et al. (2002), o meio de cultura pode afetar a produção de proteases, dependendo de fatores fisiológicos e nutricionais, como por exemplo o pH, temperatura, período de incubação e agitação, densidade do inóculo, efeito da fonte de carbono e de nitrogênio e cátions bivalentes.

A utilização de casca de soja e farelo de trigo, resíduo de soja e engaço de bananeira como fonte de carbono altera a disponibilidade de acesso ao substrato e a riqueza de nutrientes no meio de cultivo. Os subprodutos agrícolas tais como o farelo de soja e o farelo de trigo promovem um maior rendimento de proteases porque fornecem proteínas, carboidratos, lipídeos, vitaminas e minerais necessários para o crescimento do micro-organismo. Considerando as diferenças de disponibilidade de substrato relacionadas aos meios 1, 2 e 3 (1% farelo de trigo), foi feita a caracterização parcial das proteases extracelulares presentes nestes três meios de cultivo testados.

A estabilidade térmica das enzimas e a estabilidade em diferentes valores de pH são características importantes para a aplicação industrial e para o desenvolvimento dos processos de fermentação. Desta forma foi caracterizado o perfil físico-químico das enzimas proteolíticas expressas extracelularmente nos meios de cultivo.

5.4. Avaliação do perfil das proteases produzidas pelas espécies *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*

5.4.1. Caracterização das enzimas proteolíticas presentes no meio 1 produzidas pelas espécies *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*

O valor das atividades proteolíticas das espécies *P. fellutanum* e *P. restrictum* foram iguais a 48,3 UI/mL e 3,82 UI/mL respectivamente, no meio 1 e detectadas em pH iguais a 7,0 e pH 8,0 (Figura 4).

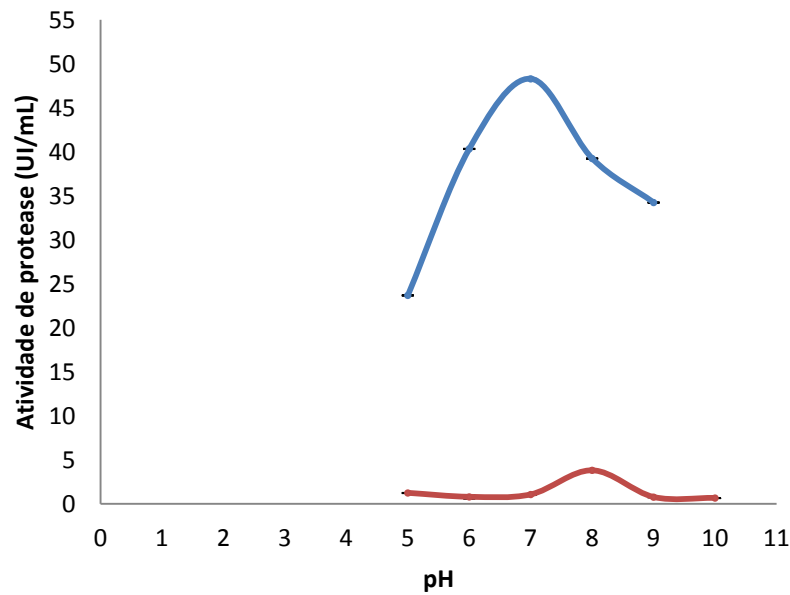


Figura 4. Efeito do pH nas atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 1 à 37 °C.

Diversos autores observaram um aumento na atividade de protease com valores de pH acima de 7,0 e máximo de 8,0. Sookkheo et al. (2000) em seu estudo observaram valores parecidos entre 7,0 e 8,5 para proteases de *Bacillus stearothermophilus*.

Para a espécie *P. fellutanum*, Rodarte (2005) relatou em seu trabalho o pH ótimo igual a 9,0 para a atividade enzimática. A autora observou uma diminuição da produção de proteases com o decréscimo no valor do pH.

A temperatura ótima e o pH ótimo de atividade enzimática é um valor muito específico de cada enzima variando entre diferentes proteases produzidas por um mesmo fungo (LI et al., 2010).

Em estudos realizados por Germano et al. (2003), os valores de pH ótimo encontrados para a produção de protease por *Penicillium* sp. variaram de 6,0 a 8,0. Segundo Beg e Gupta (2003), normalmente, as proteases que são produzidas comercialmente e que têm origem microbiana possuem sua atividade ótima na faixa de pH que varia de 8,0 a 12, o que as torna de grande interesse para utilização em formulações de detergentes, devido ao pH alto destes produtos.

A temperatura ótima das proteases presentes no meio 1 produzidas pelo *P. fellutanum* foi na faixa de 50 à 65 °C em pH 7 com atividade enzimática igual à 66,55 UI/mL. Um segundo pico de atividade pode ser observado a 65 °C, sugerindo a existência de mais de uma protease no meio líquido (Figura 5). Estes valores de atividade em pH e temperatura ótima como de se esperar foram superiores as atividades proteolíticas quantificadas em pH 5,0 e temperatura 37 °C utilizada na metodologia padrão (CHARNEY e TOMARELLI, 1947) para doseamento de protease.

Para o *P. restrictum* o efeito da temperatura na atividade das proteases foi estudado em pH 8,0 onde a temperatura ótima das proteases presentes no meio 1 foi de 45 °C com atividade enzimática igual a 7,47 UI/mL (Figura 5).

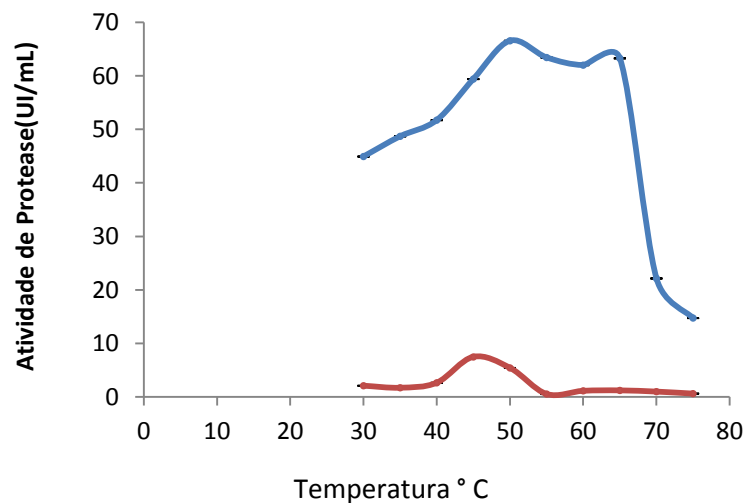
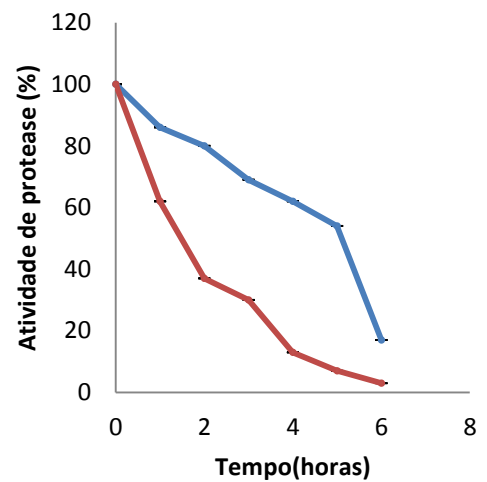
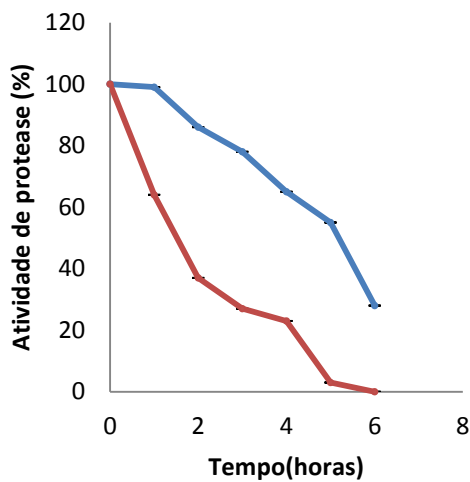


Figura 5. Efeito da temperatura sobre as atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 8,0 no meio 1.

Silva (2011) verificou a temperatura ótima de 50 °C para 100% da atividade da protease com valor igual a 1300 UI/mL produzida pelo *Aspergillus fumigatus* Fresenius.

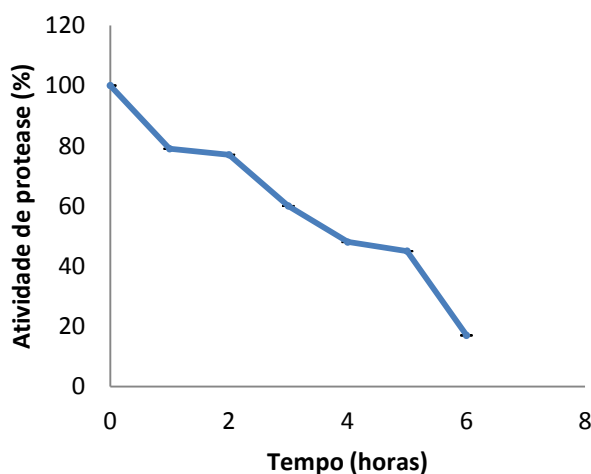
Para Moreira et al. (2002), a temperatura ótima para as enzimas alcalinas está acima de 60 °C, tendo grande potencial na indústria de detergentes e couro.

O efeito da temperatura e do tempo, na estabilidade das proteases presentes no meio 1, produzidas pelas espécies *P. fellutanum* e *P. restrictum* foi avaliado variando-se as temperaturas no intervalo entre 40 °C e 45 °C em pH 7,0 e em pH 8,0 respectivamente, no período de 6 horas (Figura 6). Para o *P. fellutanum*, a 40 °C as proteases se mostraram mais estáveis permanecendo com 86% de atividade proteolítica em até 2 horas de incubação, a 45 °C as enzimas permaneceram com 80% da atividade residual em até 2 horas. As proteases produzidas pelo *P. fellutanum* foram avaliadas também a 50 °C, e permaneceram com 77% de atividade proteolítica em 2 horas de incubação.



(A)

(B)



(C)

Figura 6. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 8,0 presentes no meio 1 a 40 °C (A); 45 °C (B) e 50 °C (C).

Para o *P. Restrictum* a 40 °C as proteases apresentaram 64% de atividade proteolítica em até 1 hora de incubação, à 45 °C as enzimas permaneceram com 62% da atividade residual em até 1 hora.

Em 1993, Phadatare et al. obtiveram uma protease produzida pelo fungo *Conidiobolus coronatus* que mostrou um elevado nível de estabilidade em pH até 8,5 sem perda de atividade a 40 °C e que foi compatível com a maior parte dos detergentes testados.

5.4.2. Caracterização das enzimas proteolíticas presentes no meio 2 produzidas pelas espécies *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*

As proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* e *P. restrictum* em cultivo no meio de cultivo 2 foram submetidas a diferentes tampões na faixa de pH 5,0-10,0 a 37 °C para a avaliação do efeito do pH nas atividades das proteases.

A melhor atividade proteolítica do fungo *P. fellutanum* no meio 2 foi igual a 14,55 UI/mL detectada em pH 7,0. Para o *P. restrictum* o pH ótimo de atividade proteolítica nesse meio foi detectado em pH 5,0 com atividade igual a 4,42 UI/mL (Figura 7).

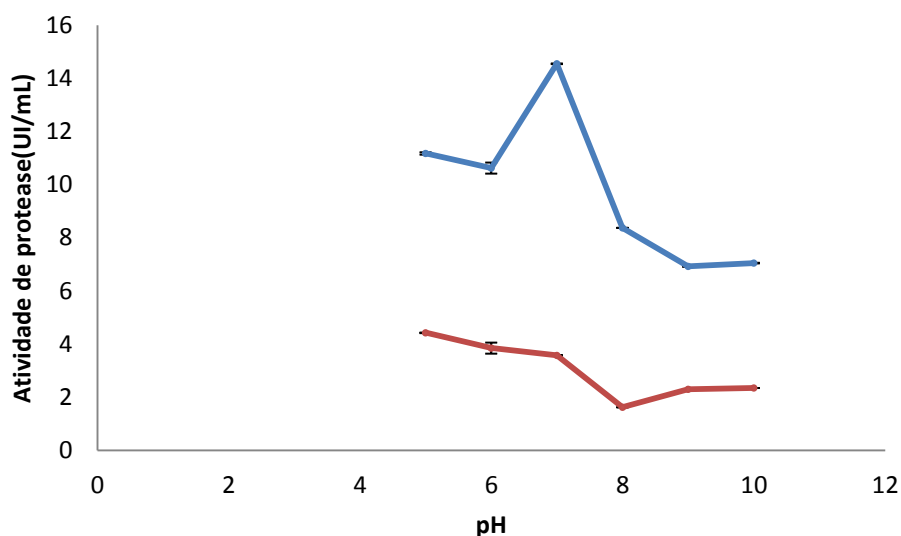


Figura 7. Efeito do pH na atividade de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 2 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona, 2% de extrato de levedura e 1% de caseína hidrolisada) à 37 °C.

Zambare et al. (2011) verificaram valores ótimos de temperatura igual a 50 °C, pH 8,0 e atividade proteolítica igual a 395 UI/mL para as proteases produzidas pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* MCMB327.

Outros estudos verificaram um valor de pH ótimo igual a 5,5 e 5,4 respectivamente, para as proteases produzidas pelo fungos *Thermoascus aurantiacus* (MERHEB et al., 2007) e *Aspergillus oryzae* (VISHWANATHA et al., 2010).

Ferrero et al. (1996) evidenciaram que a caseína foi a melhor fonte de carbono para a produção de protease termoestável por *Bacillus* sp. com atividade igual 76,37 UI/ml e que a enzima permaneceu estável por trinta minutos a 60 °C sem adição de estabilizadores.

A temperatura ótima das proteases presentes no meio 2 para o fungo *P. fellutanum* foi de 45 °C em pH 7,0 com atividade enzimática igual à 18,05 UI/mL. Para o *P. restrictum* a temperatura ótima das proteases presentes no meio 2 foi na faixa de 35 a 45 °C em pH 5,0 com atividade proteolítica igual a 8,9 UI/mL (Figura 8).

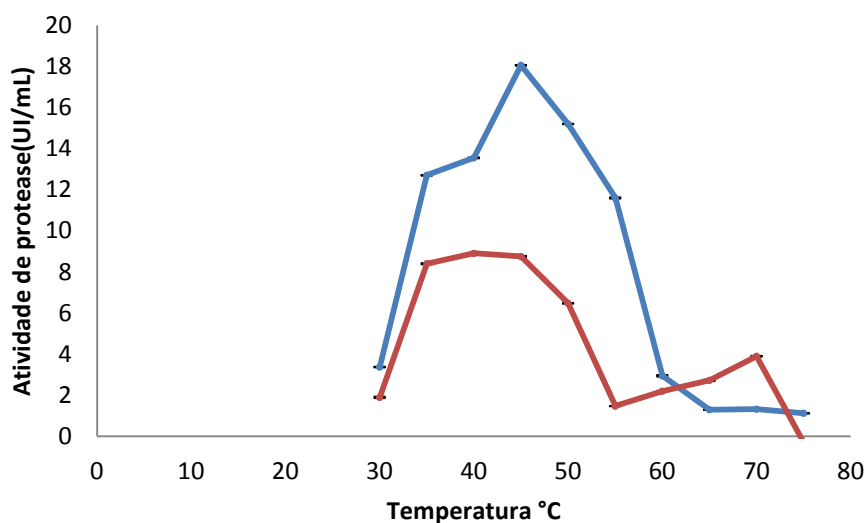
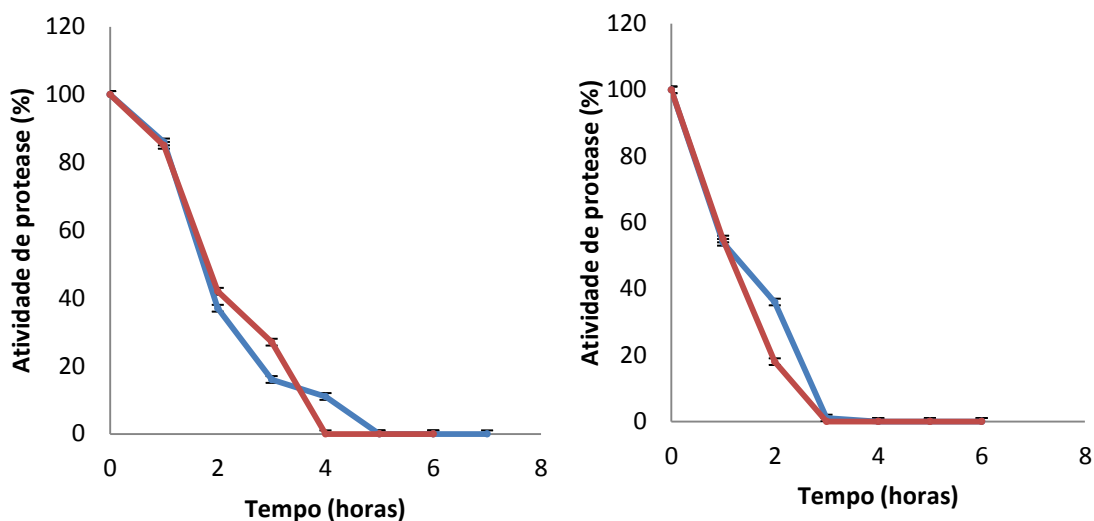


Figura 8. Efeito da temperatura sobre a atividade de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 5,0 no meio 2 (3% caldo Sabouraud, 2% peptona, 2% de extrato de levedura e 1% de caseína hidrolisada).

Em 2012, Kranthi et al. verificaram a temperatura ótima de 40 °C em pH 7,5 das proteases produzidas pelo *Aspergillus flavus*.

O efeito da temperatura na estabilidade das proteases presentes no meio 2 para o *P. fellutanum* em pH 7,0 e para o *P. restrictum* em pH 5,0 foi avaliado variando-se as temperaturas em 40 °C e 45 °C no período de 6 horas (Figura 9). Para o *P. fellutanum* a 40 °C as enzimas se mostraram mais estáveis permanecendo com aproximadamente 86% de atividade proteolítica em até uma hora de incubação, enquanto que a 45 °C a atividade proteolítica diminuiu chegando a aproximadamente 57% de sua atividade em até uma hora de incubação. Para o *P. restrictum* a 40 °C as enzimas foram mais estáveis com aproximadamente 85% de atividade proteolítica em até uma hora de incubação, e a 45 °C a atividade proteolítica diminuiu chegando a aproximadamente 55% de sua atividade em até uma hora de incubação (Figura 9).



(A)

(B)

Figura 9. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 7,0 e *P. restrictum* (vermelho) em pH 5,0 presentes no meio 2 a 40 °C (A) e 45 °C (B).

Em 2014, Hsiao et al. verificaram que as proteases produzidas pelo *Rhizopus oryzae* foram estáveis a 35 °C por 60 minutos de incubação.

5.4.3. Caracterização das enzimas proteolíticas presentes no meio 3 produzidas pelas espécies *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum*

A melhor atividade proteolítica do fungo *P. fellutanum* no meio 3 (1% de farelo de trigo e 0,4% de extrato de levedura; 0,4% de peptona; 0,2% de fosfato de potássio; 0,8% de fosfato de sódio e 0,25% de sulfato de magnésio) igual a 31,3 UI/mL foi detectada em pH 10,0. Para o fungo *P. restrictum* as melhores atividades proteolíticas iguais a 69,45 UI/mL em pH 5,0 e 64,6 UI/mL foram detectadas em pH 9,0 (Figura 10).

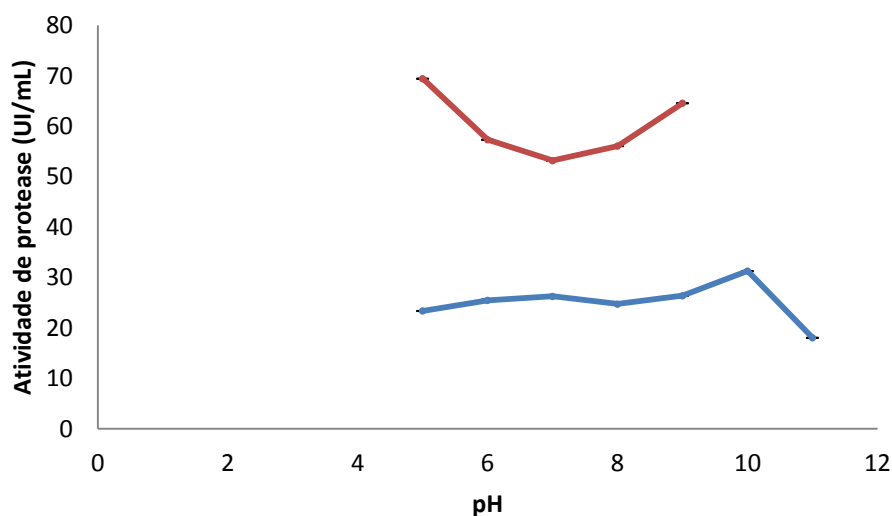


Figura 10: Efeito do pH nas atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) e *P. restrictum* (vermelho) no meio 3 à 37 °C.

Em 1996, Ferrero et al. encontraram um valor de pH ótimo igual a 9,0 para as proteases produzidas por *Bacillus lincheniformis* MIR 327.

Hajji et al. (2007) utilizaram fosfato de potássio, fosfato de sódio, sulfato de magnésio, farinha de peixe e farelo de trigo para purificar uma serino protease alcalina produzida pelo fungo *Aspergillus clavatus* ES1 isolado de águas residuais, apresentando valores ótimos de temperatura 50 °C, pH 8,5, massa molecular estimada em 32 kDa e atividade específica de 37,6 UI/mg.

A temperatura ótima das proteases presentes no meio 3 pertencentes ao fungo *P. fellutanum* foi de 55 °C em pH 10,0 com atividade enzimática igual à 54,17 UI/mL (Figura 11).

O efeito da temperatura na atividade das proteases produzidas pelo fungo *P. restrictum* no meio 3 foi estudado em pH 5,0 e em pH 9,0 na faixa de temperatura de 30 a 75 °C. Em pH 5,0 a temperatura ótima das proteases foi de 45 °C com atividade enzimática igual a 81,1 UI/mL e com outro pico de atividade em 55 °C. Em pH 9,0 a temperatura ótima foi de 40 °C com 48,1 UI/mL de atividade proteolítica (Figura 11).

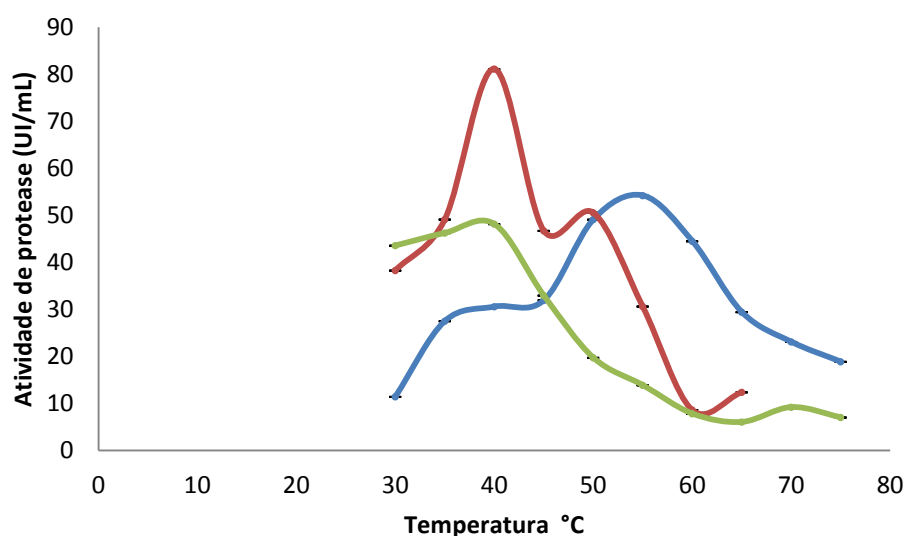


Figura 11: Efeito da temperatura sobre as atividades de proteases produzidas pelos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 10,0 e *P. restrictum* em pH 5,0 (vermelho) e em pH 9,0 (verde) no meio 3 (1% de farelo de trigo e 0,4% de extrato de levedura; 0,4% de peptona; 0,2% de fosfato de potássio; 0,8% de fosfato de sódio e 0,25% de sulfato de magnésio).

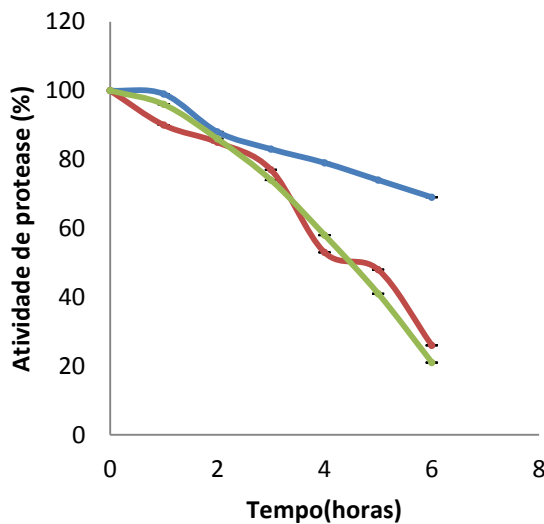
A temperatura é um dos mais importantes fatores que afetam a produção enzimática. El-Mofty et al. (2004), em um estudo com *Bacillus licheniformis* verificaram a existência de uma relação positiva entre produção de protease e incubação às temperaturas superiores a 50 °C, observando que a temperatura ótima de atividade da protease foi 55 °C, podendo ser relativamente estável a 60-65 °C.

No trabalho realizado por Tavares et al. (2012) foi encontrada uma máxima atividade enzimática a 40 °C para o gênero *Penicillium*. Outros autores publicaram para *Penicillium* spp. uma temperatura ótima de atividade proteolítica na faixa de 27 °C e 30 °C.

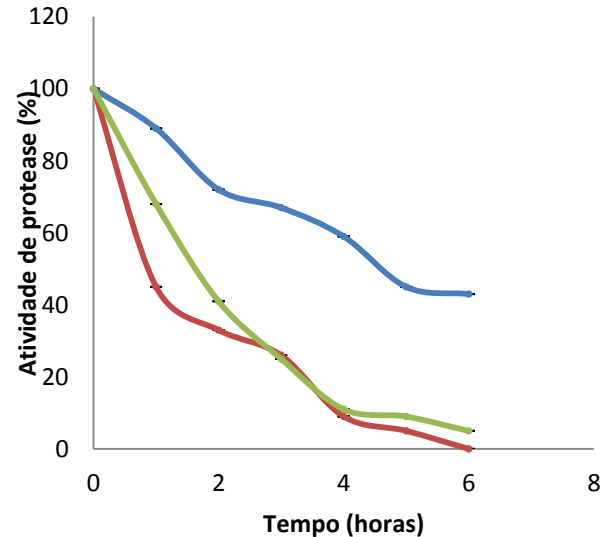
Em 2011, Zanphorlin et al. purificaram uma protease alcalina com atividade específica de 1020 U/mg do fungo termofílico *Myceliophthora* sp. utilizando farelo de trigo e caseína no meio de cultivo, os autores verificaram uma maior atividade proteolítica em pH 9,0 e temperatura ótima de 40-45 °C.

O efeito da temperatura na estabilidade das proteases presentes no meio de cultivo 3 produzidas pelo *P. fellutanum* e pelo *P. restrictum* foi avaliado variando-se as temperaturas em 40 °C e 45 °C no período de 6 horas (Figura 12). As enzimas proteolíticas produzidas pelo *P. fellutanum* em pH 10,0 foram mais estáveis a 40 °C

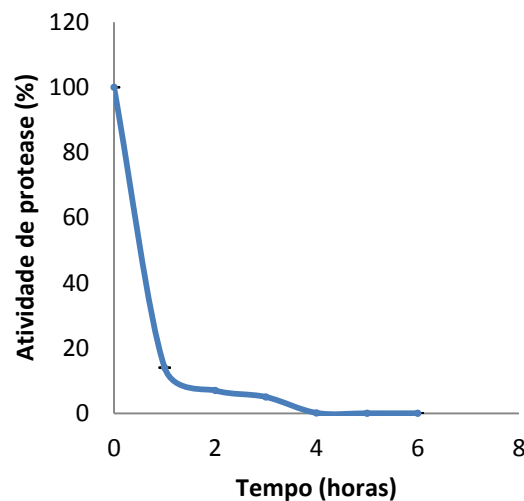
mantendo sua atividade residual de 99% em até 1 hora de incubação, à 45 °C as enzimas permaneceram com aproximadamente 89% de atividade proteolítica em até 1 hora de incubação. Para essa espécie, ainda foi avaliada a termo estabilidade das proteases à 55 °C onde rapidamente a atividade proteolítica diminuiu para 14% de atividade em até 1 hora de incubação.



(A)



(B)



(C)

Figura 12. Efeito da temperatura na estabilidade das enzimas proteolíticas dos fungos *P. fellutanum* (azul) em pH 10,0 e *P. restrictum* em pH 5,0 (vermelho) e em pH 9,0 (verde) presentes no meio 3 a 40 °C (A); 45 °C (B) e 55 °C (C).

Para o *P. restrictum* em pH 5,0 à 40 °C as enzimas proteolíticas foram mais estáveis com 90% de atividade residual por 1 hora, à 45 °C atingiram 45 % de

atividade em 1 hora de incubação. Em pH 9,0, á 40 °C as enzimas foram mais estáveis com 96 % de atividade em 1 hora e à 45 °C as enzimas apresentaram 68% de atividade por 1 hora de incubação (Figura 12).

Corrêa (2009), verificou que as proteases produzidas pelo *Bacillus* sp. P7 foram estáveis a 50 °C e permaneceram com 78% de atividade residual em dez minutos de incubação.

Shankar et al. (2011) avaliaram a estabilidade das proteases produzidas pelo fungo *Beauveria* sp.MTCC184 a 40 °C onde as enzimas proteolíticas mantiveram aproximadamente 15% de suas atividades em até uma hora de incubação.

O fungo *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou boa estabilidade mantendo 80% de atividade máxima a 30 °C (DIENES et al., 2007).

A serino protease alcalina produzida pelo fungo *Aspergillus parasiticus* manteve 90% de atividade a 30 °C por uma hora (TUNGA et al., 2003).

5.5. Perfil proteico nos três meios de cultivo avaliados

O perfil proteico dos extratos brutos dos fungos *P. fellutanum* e *P. restrictum* foi analisado por meio de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) conforme é apresentado na Figura 13.

Foram avaliados os extratos brutos dos fungos *P. fellutanum* e *P. restrictum* obtidos dos cultivos com os três meios estudados neste trabalho. A revelação das eletroforeses evidenciou várias bandas proteicas com pesos estimados entre 97 kDa e 14,4 kDa, quando comparadas a mobilidade eletroforética dos padrões de peso molecular conhecidos (fosforilase b 97; albumina 66; ovoalbumina 45; anidrase carbonica 30; inibidor de tripsina 20.1 e α -lactalbumina 14,4 kDa – GE life sciences).

A literatura cita outros micro-organismos produtores de proteases que apresentaram pesos moleculares estimados entre 33 e 88 kDa, como o *Penicillium camemberti* com 33 kDa (CHRZANOWSKA et al., 1995), o *Rhizopus oryzae* com 39 kDa (HSIAO et al., 2014), o *Aspergillus oryzae* MTCC5341 com 47 kDa (VISHWANATHA et al., 2010), o *Chryseobacterium* sp. Kr6 com 64 kDa (RIFFEL, 2006), o *Cryseobacterium taeanense* TKU 001 com 75 kDa (WANG et al., 2008) e o *Aspergillus fumigatus* com 88 kDa (HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2011).

As amostras da espécie *P. restrictum* obtidas dos cultivos no meio 3 também foram submetidas a eletroforese não desnaturante em gel de poliacrilamida (PAGE) contendo 1mg/mL de gelatina. A atividade protéica no gel foi visualizada através do zimograma. Estes resultados indicaram a presença de uma banda com atividade proteolítica na parte superior do zimograma (Figura 14).

Segundo a literatura, algumas serino proteases apresentam pesos moleculares estimados entre 28 e 88 kDa, ativas em pH entre 7,0 e 9,0, tais como: *Myceliophthora* sp.com 28 kDa e pH 9,0 (ZANPHORLIN et al., 2011); o *Aspergillus clavatus* ES1 com 32 kDa e pH 8,5 (HAJI et al., 2007); o fungo *Beauveria* sp. MTCC5184 com 29 kDa e pH 9,0 (SHANKAR et al., 2011); o *Clonostachys rosea* com 33 kDa e pH 9,0 (LI et al., 2012) e o *Aspergillus fumigatus* com peso molecular estimado em 88 kDa e pH 7,0 (HERNANDEZ-MARTINEZ et al., 2011).

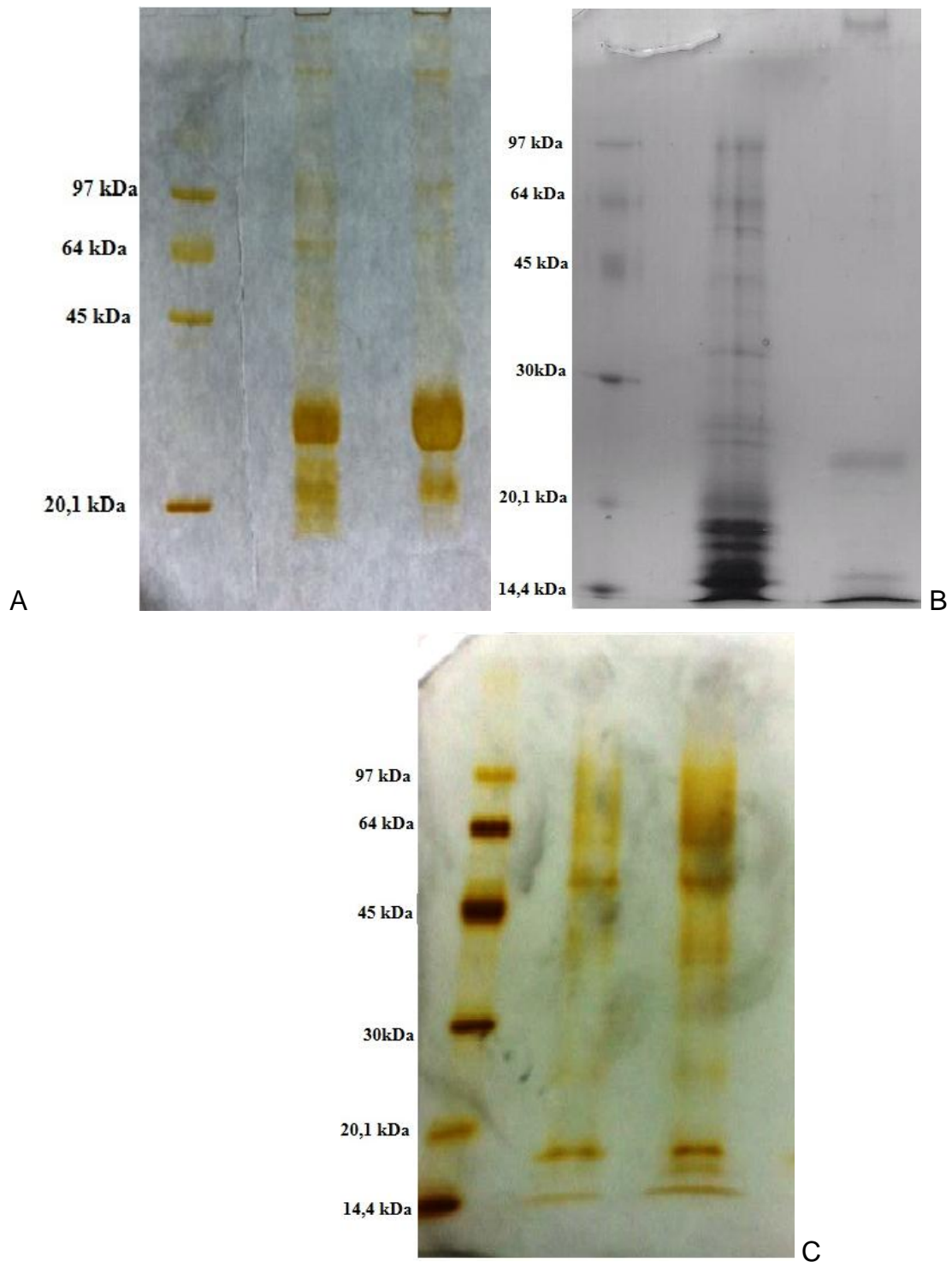


Figura 13. (A) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com amostras dos extratos brutos produzidos no meio 1: linha (1) marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 kDa); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*. (B) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos brutos produzidos no meio 2: linha (1) marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 kDa); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*. (C) Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) dos extratos brutos produzidos no meio 3: linha (1) marcador de peso molecular (97; 66; 45; 30; 20.1 e 14.4 kDa); linha (2) *P. fellutanum*; linha (3) *P. restrictum*.



Figura 14. Zimograma para atividade proteolítica, bandas com atividade proteolítica produzidas pelo fungo *P. restrictum* no meio 3 indicadas pelas setas na figura: (A) gel após 30 minutos a 40 °C; (B) gel após 6 horas a 40 °C.

5.6. Avaliação de proteases expressas por fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* após crescimento nos meios de cultivos 1, 2 e 3

Em relação aos meios de cultivo utilizados, observou-se que ao mudar o meio de cultura houve um aumento da atividade proteolítica para os dois fungos quando cultivados no meio 3 (farelo de trigo) (Figura 15). As proteases do *P. fellutanum* apresentaram atividade igual a 54,17 UI/mL e as proteases do *P. restrictum* com atividade igual a 81,1 UI/mL. Ao comparar os valores obtidos com os valores pesquisados de micro-organismos produtores de protease, que também utilizaram o farelo de trigo no meio de cultivo, tais como: o *Penicillium griseoroseum* com atividade proteolítica igual a 5,6 UI/mL (IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2007); o *Aspergillus* sp. com atividade igual a 30,5 UI/mL (SANDHYA et al., 2005); o *Beauveria felina* com atividade proteolítica igual a 20 UI/mL (AGRAWAL et al., 2005) e o *Myceliophthora* sp. com atividade proteolítica igual a 1020 U/mg (ZANPHORLIN et al., 2011), foi verificado que os resultados obtidos são vantajosos, pois o uso de farelo de trigo, por ser um substrato de baixo custo, é uma alternativa para reduzir os custos de produção.

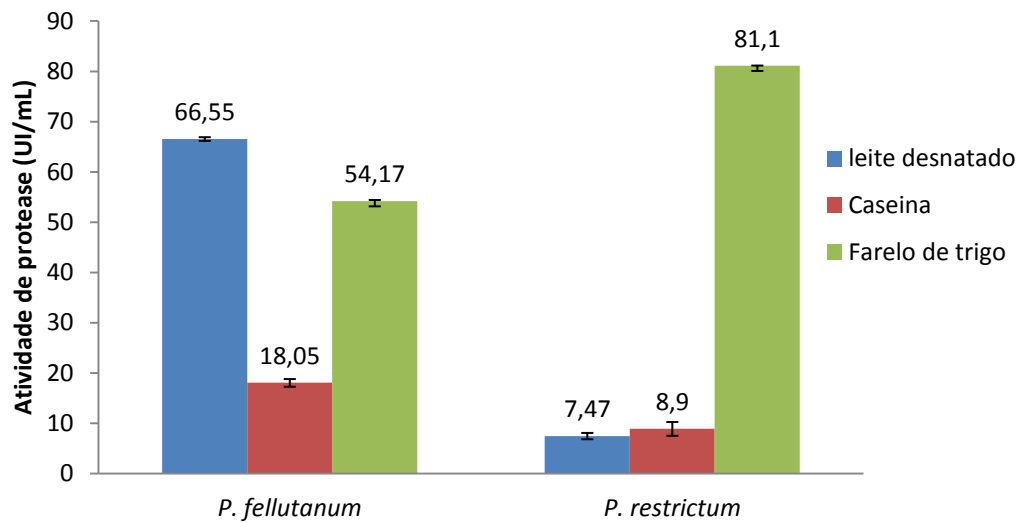


Figura 15. Atividades ótimas de proteases extracelulares apresentadas pelos fungos filamentosos *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* após crescimento nos meios de cultivo 1, 2 e 3 e determinadas em pH ótimo e temperatura ótima para as respectivas enzimas.

Os resultados são interessantes para a aplicação industrial destas enzimas, uma vez que as proteases, termoestáveis e ativas em pH ácidos e básicos, têm sido largamente utilizadas na indústria de cosméticos e de detergentes. Outra qualidade importante revelada neste trabalho foi que as proteases produzidas pelas duas espécies de *Penicillium* apresentaram estabilidade térmica a 40 °C. As proteases produzidas pelo *P. fellutanum* foram estáveis por 2 horas no meio 1, e no meio 3, estáveis por 1 hora a 40 °C. Para o *P. restrictum* as proteases foram estáveis no meio 3 por 1 hora à 40 °C (Tabela 6).

Tabela 6. Resumo dos melhores valores de pH e temperatura para atividade de proteases extracelulares produzidas por *P. fellutanum* e *P. restrictum* em estufa com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias.

Fungos	pH ótimo/ Meio	Temperatura ótima °C	Atividade proteolítica (UI/mL)	Termoestabilidade
<i>Penicillium</i>	7,0 meio 1	50	66,5	40°C 86% 2 h
<i>fellutanum</i>	10,0 meio 3	55	54,1	40°C 99% 1h
<i>Penicillium</i>	5,0 meio 3	45	81,1	40°C 90% 1h
<i>restrictum</i>	9,0 meio 3	40	48,1	40°C 96% 1h

Nas habituais condições de lavanderias industriais as enzimas são utilizadas por 10 minutos a 60 °C (FERRERO et al., 1996).

Outros micro-organismos produtores de protease apresentaram os seguintes valores de estabilidade térmica: o *Streptomyces flavogriseus* HS1 apresentou estabilidade a 50 °C por 1 hora (GHORBEL et al., 2014); o *Aspergillus fumigatus* Fresenius com 90% de atividade a 40 °C por 30 minutos (SILVA, 2011); o *Bacillus* sp. estável a 60 °C por 30 minutos (FERRERO et al., 1996); o *Chryseobacterium* sp. Kr6 com 80% de atividade a 37°C por 3 horas (RIFFEL, 2006); o *Thermoraseus aurantiacus* estável a 60 °C por 1 hora (MERHEB et al., 2007).

Comparando as atividades proteolíticas produzidas pelas duas espécies *P. fellutanum* e *P. restrictum* nos meios de cultivo 1, 2 e 3 utilizados neste trabalho, verificamos que o *P. restrictum* apresentou a melhor atividade proteolítica no meio 3 com valores de pH ótimos de 5,0 e 9,0 de interesse industrial. Sendo assim, foi avaliado o comportamento das proteases produzidas pela espécie *P. restrictum* frente aos íons metálicos e interferentes geralmente presentes nas formulações detergentes (Tabela 7).

No estudo sobre o efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica observou-se que as proteases foram estáveis na maioria dos íons testados. Os íons Ca^{+2} e Mg^{+2} estimularam a atividade proteolítica, segundo Anitha e Palanivelu (2013) esse fenômeno é típico para as proteases do tipo serina. Foi observada uma inibição

da atividade proteolítica por Cu^{+2} semelhante ao que foi relatado por esses autores na produção de queratinase pelo fungo *Aspergillus parasiticus*. O íon Hg^{+2} foi o maior responsável pelo efeito repressor da atividade enzimática, reduzindo a 37% o nível de atividade residual.

Tabela 7. Efeito de íons metálicos e inibidores sobre a atividade de proteases produzidas por *P. restrictum*

Interferentes (4mM)	Atividade residual (%)
Controle	100
HgCl_2	37
MgSO_4	121
ZnSO_4	111
CaCl_2	126
K_2SO_4	121
CuSO_4	77
MnSO_4	142
FeSO_4	111
EDTA	121
SDS	315

Na presença de alguns compostos houve um aumento da atividade proteolítica ocasionada por EDTA e SDS. A atividade proteolítica apresentou um aumento residual de 315%, quando incubada em SDS, sugerindo assim um potencial campo de aplicação para esta enzima, junto às formulações de detergentes, onde são empregados surfactantes como insumos. Jain et al. (2012) purificaram e caracterizaram uma protease de *Bacillus sp.* com características halo-alcalina e termo tolerante que teve sua atividade aumentada em 3,3 vezes quando incubada com SDS, mostrando o potencial desta enzima como aditivo na composição de produtos da indústria de detergentes. Estes autores classificaram esta enzima como serino-protease que manteve as atividades enzimáticas na faixa de pH entre 8-12, com temperaturas variando entre 20-80 °C e tolerância salina superior a 20%. Deste modo, os resultados deste trabalho sugerem uma caracterização mais detalhada desta enzima e um teste em formulações de detergentes como foi feito do trabalho demonstrado por Jain et al. (2012).

Diminuição da atividade proteolítica com Hg^{+2} também foi observada por Corrêa (2009) quando purificou parcialmente a protease queratinolítica produzida por *Bacillus* sp.P7.

Em 1996, Ferrero et al. observaram na produção de uma protease alcalina produzida pelo *Bacillus licheniformis* MIR 29 que os íons Ca^{+2} não aumentaram a atividade proteolítica, enquanto o EDTA não inibiu a atividade e o SDS inibiu ligeiramente .

Abidi et al. (2011), observaram que os íons Hg^{+2} , Mn^{+2} e Fe^{+2} não exerceram efeito sobre a atividade da protease produzida pelo fungo *Botrytis cinérea*, porém o íon Mg^{+2} diminuiu ligeiramente, enquanto que com os íons Co^{+2} e Cu^{+2} inibiram bastante, ao contrário, dos íons Zn^{+2} , Ca^{+2} e Ba^{+2} estimularam a atividade.

Germano et al. (2003), caracterizaram uma protease produzida pelo fungo *Penicillium* sp. com pH ótimo igual a 6,5 e temperatura de 45 °C, com atividade aumentada na presença de íons metálicos Ca^{2+} e Na^{+} sendo estável com detergentes comerciais e agentes oxidantes.

Diversos autores concordam que as proteases produzidas pelo gênero *Penicillium* são promissoras na utilização pela indústria (ROSA et al., 2006; TAVARES et al., 2012). Rodarte (2005) isolou 66 fungos filamentosos em caseína e observou a formação de ativação proteolítica em 50% dos micro-organismos. Dentre os isolados estava o *Penicillium fellutanum*. Segundo a autora, os fungos filamentosos são ótimos produtores de proteases.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

- Das 17 diferentes espécies de fungos isoladas do solo do Cerrado, 8 espécies foram produtoras de protease.
- Para o fungo *Penicillium fellutanum* o meios de cultivo 1 e 2 com agitação a 28 °C, 150 rpm por 7 dias, proporcionaram a maior produção de proteases. Para o fungo *Penicillium restrictum* o meio de cultivo 3 contendo farelo de trigo, induziu uma maior produção de proteases extracelulares nas condições estabelecidas 28 °C, 150 rpm por 7 dias.
- A caracterização das proteases presentes nos extratos brutos revelou que as temperaturas ótimas destas enzimas variaram de 40 a 55 °C com um pH ótimo entre 5,0 e 10,0 dependendo do meio de cultivo avaliado.
- Os íons metálicos Mg^{+2} , Zn^{+2} , Ca^{+2} , K^+ , Mn^{+2} e Fe^{+2} estimularam a atividade das enzimas proteolíticas produzidas por *P. restrictum*, enquanto que os íons Hg^{+2} e Cu^{+2} reduziram sua atividade.
- O agente surfactante SDS aumentou a atividade das enzimas proteolíticas de *P. restrictum*, demonstrando potencial aplicação na indústria de detergentes.
- Estes parâmetros são de grande importância para avaliar as aplicações biotecnológicas possíveis para estas enzimas. Porém faz se necessário dar continuidade para estes estudos, purificando a protease mais estável em pH básico e temperatura maior que 45 °C, visando uma aplicação na indústria de detergentes, ou purificando uma segunda protease estável em pH ácido e temperaturas próximas a 40 °C visando a aplicação em cosméticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi FJM, Chobert T, Haertlée M, Marzouki N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. *Process Biochem*, 46:2301–2310, 2011.

Agrawal D, Patidar P, Banerjee T, Patil S. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. *Process Biochem*, 40:1131–1136, 2005.

Aleksieva P, Peeva L. Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. *Enzyme Microb Technol*, 26:402–405, 2000.

Almeida RG, Mazzo A, Mendes IA, Trevizan MA, de Godoy S. Characterization of the assistance of a hematology unit. *Rev Bras Enferm*, 64:1082-1086, 2011.

Alves LA, Vitolo M, Felipe MD, De Almeida e Silva JB. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate employing experimental design. *Appl Biochem Biotechnol*, 98-100:403-413, 2002.

Anandan D, Marmer WN, Dudley RL. Isolation, characterization and optimization of culture parameters for production of an alkaline protease isolated from *Aspergillus tamarii*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 34:339-347, 2007.

Anitha TS, Palanivelu P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Protein Expr Purif*, 88:214–220, 2013.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists (1995). Official methods of analysis of the association of the analytical chemists, 16 ed, Washington.

Beg QK, Gupta R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb Technol*, 32:294–304, 2003.

Boyce A, Walsh G. Identification of fungal proteases potentially suitable for environmentally friendly cleaning-in-place in the dairy industry. *Chemosphere*, 88: 211–218, 2012.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72:248-254, 1976.

Bruce EM. Inhibitors of serine proteases as potential therapeutic agents: the road from thrombin to tryptase to cathepsin G. *J Med Chem*, 47:769–787, 2004.

Callis J. Regulation of Protein Degradation. *Plant Cell*, 7:845-857, 1995.

Charney J, Tomarelli RM. "A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice." *J Biol Chem*, 17: 501-505, 1947.

Chaud LCS, Vaz PV, Felipe MG. Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. *Nucleus*, 4:1-2, 2007.

Chrzanowska J, Kolaczowska M, Dryjariski M, Stachowiak D, Polanowski A. Aspartic proteinase from *Penicillium camemberti*: Purification, properties, and substrate specificity. *Enzyme Microb Technol*, 17:719-724, 1995.

Colen G. Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases. Faculdade de Farmácia da UFMG, (Belo Horizonte-MG), 2006 [Tese de Doutorado].

Corrêa APF. Purificação e parcial e caracterização de uma protease alcalina querotolínica de *Bacillus* sp.P7. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 1-89, 2009 (Dissertação de Mestrado).

De Paris LD. Produção de Enzimas Fúngicas por Fermentação em Estado Sólido das Sojas Orgânica, Transgênica e Convencional. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008 (Dissertação de Mestrado).

Dienes D, Borjesson J, Hagglund P, Tjerneld F, Lidén G, Reczey K, Ståhlbrand H. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. *Enzyme Microb Technol*, 40:1087–1094, 2007.

Dini CM. Produção, purificação e caracterização da protease de *Thermomucor indicae-seudaticae* n31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, 2010 [Tese de doutorado].

Djamel C, Ali T, Nelly C. Acid Protease Production by Isolated Species of *Penicillium*. *Eur J Sci Res*, 25:3:469-477, 2009.

El-Mofty M, Mostafa W, Esmat S, Youssef R, Bousseila M, Nagi N, Shaker O, Abouzeid A. Suggested mechanisms of action of UVA phototherapy in morphea: a molecular study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 20:93-100, 2004.

Evangelista EA, Galban VD, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I. Role of ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic process in degradation of muscle protein from diabetic rabbits. *Mol Cell Biochem*, 225:35-41, 2001.

Ferrero MA, Castro GR, Abate CM, Baigorõ D, Sineriz F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29:isolation, production and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol*, 45:327-332,1996.

Fleuri LF, Sato HH. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Química Nova*, 28: 871-879, 2005.

Freitas AC. Produção de extração enzimática proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida. Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Fortaleza, 2013 [Tese de doutorado].

Furtado C, Pebody RG, Rojas A, McCarthy N, Nylén G, Ruutu P, Leino T, Chalmers R, de Jong B, Donnelly M et al. An international outbreak of Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infection amongst tourists; a challenge for the European infectious disease surveillance network. *Epidemiol Infect*, 123:217-223, 1999.

Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J*, 28:1317-1330. 2013.

Geok L. Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. *Bio Eng J*, 13:73-77, 2003.

Germano S, Pandey A, Osaku CA, Rocha SN, Soccol CR. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 32:246–251, 2003.

Ghorbel S, Kammoun M, Soltana H, Nasri M, Hmidet N. *Streptomyces flavogriseus* HS1: Isolation and Characterization of Extracellular Proteases and Their Compatibility with Laundry Detergents. *BioMed Res Int*, 1-8, 2014.

Giongo JL. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Micorbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR- RS, 1-95, 2006 (Dissertação de Mestrado).

Guimarães ICO, Souza ARM, Cornélio VMO, Pereira J, Villela VA. Identificação de *Aspergillus spp.* toxigênico em arroz. *Ciência e Tecnologia de alimentos*, 2010.

Gupta R, Beg QK, Khan S, Chauhan B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60:381–395, 2002.

Hajji M, Kanoun S, Nasri M, Gharsallah N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochem*, 42:791–797, 2007.

Hernández-Martínez R, Gutiérrez-Sánchez G, Bergmann CW, Loera-Corral O, Rojo-Domínguez A, Huerta-Ochoa S, Regalado-González LC, Prado-Barragán A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochem*, 46:2001–2006, 2011.

Hombergh JPTW, Vondervoort PJI, Laurence FT, Visser J. *Aspergillus* as a host heterologous protein production the problem of proteases. TIBTECH, 15,1997 (reviews).

Hsiao NW, Chen Y, Kuan Y-C, Lee Y-C, Lee S-K, Chan H-H, Kao C-H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. Electronic J Biotechnol, 2014 [Epub ahead of print].

Hua Y e Nair S. Proteases in cardiometabolic diseases: pathophysiology, molecular mechanisms and clinical applications. Biochim Biophys Acta, 2014 [Epub ahead of print].

Ikram-Ul-Haq, Mukhtar H. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. Pak J Bot, 39:2717-2724, 2007.

Jain D, Pancha I, Mishra SK, Shrivastav A & Mishra S. Purification and characterization of haloalkaline thermoactive, solvent stable and SDS-induced protease from *Bacillus* sp.: A potential additive for laundry detergents. *Bioresource Technology* 115: 228-236, 2012.

Joo HS, Chang CS. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. Process Biochem, 40:1263–1270, 2005.

Kranthi VS, Rao DM, Jaganmohan P. "Production of Protease by *Aspergillus flavus* Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes." Int J Microbiol Res, 3:12-15, 2012.

Kumar CG, Takagi H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol Adv, 17:561–594, 1999.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685, 1970.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Princípios de Bioquímica, 1995.

Li J, Yang J, Huang X, Zhang K. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochem*, 41:925–929, 2012.

Li N, Zong MH. Lipases from the genus *Penicillium*: Production, purification, characterization and applications. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 66:43–54, 2010.

Lods LM, Dres C, Johnson C, Scholz DB, Brooks GJ. The future of enzymes in cosmetics. *Int J Cosmetic Sci*, 22:85-94, 2000.

Lopes JLS. Purificação e Investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe. Universidade de São Paulo, 2006 [Tese de Doutorado].

Macchione MM, Merheb CW, Gomes E, Da Silva R. "Protease production by different thermophilic fungi." *Appl Biochem Biotechnol*, 146: 223-230, 2008.

Malathi S, Chakraborty R. "Production of Alkaline Protease by a New *Aspergillus flavus* Isolate under Solid-Substrate Fermentation Conditions for Use as a Depilation Agent." *Appl Environ Microbiol*, 57: 712-716, 1991.

Manivannan S, Kathiresan K. Alkaline Protease Production by *Penicillium fellutanum* isolated from Mangrove Sediment. *Int J Biol Chem*, 1:98-103, 2007.

Maziero MT, Bersot LS. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. *Rev Bras Prod Agroin*, 12: 89-99, 2010.

Merheb CW, Cabral H, Gomes E, Da-Silva R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104:127-131, 2007.

Moreira KA, Silva ACJ, Bezerra RS, Carvalho-Júnior LB, Teixeira MFS, Chaves AC, Porto ALF, Lima-Filho JL. Estudos preliminares das propriedades cinéticas da protease alcalina de *Nocardia* sp In: *Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática*, 1-5, 2002, Brasília (resumos).

Nascimento WCA, Silva CR, Carvalho RV, Martins MLL. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. Termofílico. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 2007.

Orlandelli RC, Specian V, Felber AC, Pamphile JA. Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. SaBios: Rev Saúde e Biol, 7:97-109, 2012.

Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. Trends in Biochem Sci, 34:1-9, 2009.

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 Microb Technol, 1-15, 1993.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge SM, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiol Mol Biol Rev, 62: 597–635, 1998.

Raval VH, Pillai S, Rawal CM, Singh SP. Biochemical and structural characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from seawater haloalkaliphilic bacteria. Process Biochem, 49: 955–962, 2014.

Ravikumar G, Gomathi D, Kalaiselvi M, Uma C. A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*: production, purification and partial characterization Asian Pac J Trop Biom, 411-417, 2012.

Rawlings ND, Mortone FR, Barrett AJ. An introduction to peptidases and the merops database. Industrial Enzymes Structure, Function and Applications. Spriner, 161-179, 2007.

Riffel A. Avaliação de proteases extracelulares da linhagem *Chryseobacterium* sp.kr6 e purificação e caracterização de uma metaloprotease queratinolítica. Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, BR-SP, 1-98, 2006 [Tese de Doutorado].

Rodarte, MP. Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.). Universidade Federal de Lavras. Lavras : UFLA,1-86, 2005 (Dissertação de Mestrado).

Rosa DR, Cammarota MC, Freire DMG. Production and Utilization of a Novel Solid Enzymatic Preparation Produced by *Penicillium restrictum* in Activated Sludge Systems Treating Wastewater with High Levels of Oil and Grease. Environ Eng Sci, 23:1-5, 2006.

Said S, Pietro R. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Rio de Janeiro: Eventos Ed,1-121, 2002.

Saleemuddin M, Anwar A. Alkaline proteases:a review. Bioresour Technol, 64:175-183,1998.

Sanatan PT , Lomate PR, Giri AP and Hivrale VK. Characterization of a chemostable serine alkaline protease from *Periplaneta americana*. BMC Biochemistry, 14:1-32, 2013.

Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G, Pandey A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem, 40:2689-2694,2005.

Saran S, Isar J, Saxena RK. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. J Biochem Biophys Methods, 70:697–699, 2007.

Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Feng Huei Lin. Fungal protease: Production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance performance. J Taiwan Inst Chem Eng, 42:298–304, 2011.

Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. Planta, 220:183-197, 2004.

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

Silva RR. Fermentação, Purificação e Caracterização da protease Produzida Pelo Fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, 2011(Dissertação de Mestrado).

Singh J, Batra N, Sobti RC. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochem*, 36:781–785, 2001.

Siqueira FG. Resíduos Agroindustriais com Potencial para a produção de Holocelulases de Origem Fúngica e Aplicações Biotecnológicas de Hidrolases. Universidade de Brasília. Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Biologia Celular. Brasília, 2010 [Tese de Doutorado].

Sookkheo B, Sinchaikul S, Pheitrakul S, Chen ST. Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expr Purif*, 20:142-51, 2000.

Souza HQ, Oliveira LA, Andrade J S. Seleção de Basidiomycetes da Amazônia para produção de enzimas de interesse biotecnológico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 28:116-124, 2008.

Stenzel M. Solubilização enzimática de proteína do farelo de soja e caracterização funcional dos hidrolisados formados. Maringá: Engenharia Química, 2007 [Tese de Doutorado].

Tavares ACD, Da Fonseca JS, Da Fonseca TRB, Barroncas JF, Souza RAT, Silva TA, Teixeira MFS. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. *BBR – Biochem Biotechnol Rep*, 1:1-6, 2012.

Thys RCS. Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microorganismo *Microbasacterium* sp. Kr10. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, 2004 (Dissertação de Mestrado).

Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochem*, 38:1553-1558, 2003.

Vargas GDLP, Treichel H, Oliveira D, Beneti SC, Freire DMG, Luccio M. Optimization of lipase production by *Penicillium simplicissimum* in soybean meal. *J Chem Technol Biotechnol*, 83:47-54, 2007.

Vermelho AB, Melo ACN, Sá MHB, Santos ALS, Avila-Levu CM, Courie S, Bom EPS. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado*. Interciência, 273-287, 2008.

Vishwanatha KS, Rao A AG, Singh SA. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process Parameters. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37:129–138, 2010.

Vranova V, Rejsek K, Formanek P. Proteolytic activity in soil: A review. *Applied Soil Ecology*, 70:23– 32, 2013.

Wang SL, Yang CH, Liang TW, Yen YH. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresour Technol*, 99:3700–3707, 2008.

Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnol Adv*, 30:1119-1139, 2011.

Zambare V, Nilegaonkar S, Kanekar P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. *New Biotechnology*, 28:1-68, 2011.

Zanphorlin LM, Cabral H, Arantes E, Assisc D, Juliano L, Juliano MA, Da-Silva R, Gomes E, Bonilla-Rodriguez GO. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochem*, 46:2137–2143, 2011.