

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

RECUPERAÇÃO DE PROTEASE DE *Aspergillus terreus* VSP-22 POR SISTEMA
BIFÁSICO AQUOSO PEG/FOSFATO DE SÓDIO

Sabrina Laís Bispo Magalhães

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

RECUPERAÇÃO DE PROTEASE DE *Aspergillus terreus* VSP-22 POR SISTEMA
BIFÁSICO AQUOSO PEG/FOSFATO DE SÓDIO

Sabrina Laís Bispo Magalhães

Edgar Silveira Campos
Nathiele Contrera Gimenes

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Biotecnologia, da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do grau
de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

RECUPERAÇÃO DE PROTEASE DE *Aspergillus terreus* VSP-22 POR SISTEMA
BIFÁSICO AQUOSO PEG/FOSFATO DE SÓDIO

Sabrina Laís Bispo Magalhães

Edgar Silveira Campos
Instituto de Biotecnologia

Nathiele Contrera Gimenes
Faculdade de Engenharia Química - Unicamp

Homologado pela coordenação do Curso de
Biotecnologia em __/__/__

Nilson Nicolau Junior

Uberlândia - MG
Novembro – 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

RECUPERAÇÃO DE PROTEASE DE *Aspergillus terreus* VSP-22 POR SISTEMA
BIFÁSICO AQUOSO PEG/FOSFATO DE SÓDIO

Sabrina Laís Bispo Magalhães

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Edgar Silveira Campos
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, de de

Agradecimentos

À Jeová Deus, pelo amor e bondade imerecidos;

À minha mãe, Shirley, por tudo. Sou muito grata a Deus por tê-la em minha vida;

Aos meus irmãos, Rian e Emanuele, pelo apoio, amizade e bons momentos juntos;

Aos meus parentes e amigos, pelo carinho;

Ao meu orientador, Edgar, pela disposição e paciência ao ensinar;

À minha coorientadora, Nathiele, pela atenção e por ter me ensinado muito ao longo da graduação;

Aos professores da Universidade Federal de Uberlândia, pela contribuição para minha formação.

RESUMO

As proteases são enzimas proteolíticas, destacam-se principalmente no setor de indústrias alimentícias, têxteis e de detergentes. Porém, a obtenção dessas por fontes vegetais e animais é limitada, além do alto custo para produção. Assim, o objetivo desse trabalho foi extrair protease de fonte fúngica, realizar testes de recuperação, caracterização e aplicação da mesma. A protease proveniente do fungo filamentosso *Aspergillus terreus* VSP-22 foi obtida pela fermentação em estado sólido. A partir do extrato enzimático bruto, a enzima foi recuperada pelo método do sistema bifásico aquoso PEG/fosfato de sódio e, ele permitiu recuperação máxima de 31,69 % da biomolécula, e máximo fator de purificação de 70,85. No teste de coagulação, a protease em seu estado bruto apresentou melhor atividade na solução 0,04 mol/L de CaCl₂. Para a caracterização enzimática, a melhor atividade catalítica foi encontrada no pH 7,4 e em temperatura de 45°C. Essa pesquisa permitiu produzir, extrair, caracterizar e recuperar a enzima, além de avaliar sua capacidade de coagulação antes da etapa de recuperação. Este estudo, contribuiu para uma nova perspectiva na produção de protease com potencial biotecnológico e industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*; Fermentação em estado sólido; Recuperação.

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Enzimas	3
1.1.1. Enzimas microbianas.....	6
1.2. Proteases	11
1.3. Fermentação em estado sólido.....	12
1.4. Sistemas Bifásicos Aquosos (SBA).....	14
2. Objetivos	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Produção da Protease e Extrato Enzimático	17
3.2. Extração por Sistema Bifásico Aquoso	17
3.2.1. Equações para cálculo das variáveis	18
3.3. Atividade Proteolítica	19
3.4. Determinação de Proteínas Totais	20
3.5. Teste de Coagulação do Leite.....	20
3.6. Caracterização da Protease	21
3.6.1. pH Ótimo.....	21
3.6.2. Temperatura Ótima	21
4. Resultados e Discussão	Erro! Indicador não definido.
4.1. Avaliação da Extração da Protease utilizando Sistema Bifásico Aquoso PEG/fosfato de sódio	Erro! Indicador não definido.
4.2. Atividade Proteolítica frente à Coagulação do Leite.....	26
4.3. Caracterização da protease	28
4.3.1. Efeito do pH sobre a Atividade Proteolítica.....	28
4.3.2. Efeito da temperatura frente à Atividade Proteolítica	29
5. Conclusão	31
6. Referências Bibliográficas	32

Introdução

As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas, e são classificadas quanto ao mecanismo de reação, local de ação e estrutura do sítio enzimático ativo. Elas são fundamentais em processos como a diferenciação e morte celular, coagulação sanguínea e defesa no sistema imunológico. As enzimas proteolíticas apresentam um grande valor econômico, substituindo vários catalisadores químicos e colaborando com a proteção ambiental (Ward, 2011).

Na indústria alimentícia as proteases são utilizadas na panificação, alterando a elasticidade e textura do glúten, e em laticínios é responsável pela coagulação das proteínas do leite para produção de queijos. No segmento têxtil, melhora a qualidade do produto final nas etapas de tingimento e brilho, e mais especificamente para melhora da qualidade da fibra de seda. Também podem ser usadas na indústria farmacêutica, são aplicadas com finalidade terapêutica em queimaduras e cicatrizes. Outro setor, é a produção de cosméticos (Pereira, 2017).

O destaque das proteases deve-se a sua diversidade bioquímica e fácil manipulação, porém a obtenção destas por meio de fontes vegetais e animais, enfrenta altos custos e processos burocráticos que dificultam sua aquisição e atrasam os projetos que envolvem suas aplicações (Ractz, 2015). Diante disso, as enzimas de origem microbiana destacam-se pelo maior potencial de aplicação, fácil produção em larga escala e em espaço reduzido, além do uso de resíduos agroindustriais como substrato.

Os resíduos agroindustriais são obtidos a partir do processamento industrial de produtos agrícolas, e a sua composição é rica em açúcares fermentáveis e nutrientes que são convertidos pelos microrganismos em vários produtos, como as enzimas, importantes para a indústria. Esses resíduos além de reduzir os custos de produção, e manter o rendimento proporcional aos

substratos sintéticos, também contribui para diminuição do acúmulo desses materiais no meio ambiente (Dos Santos et al., 2018).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos se distinguem pela diversidade, crescem naturalmente em substratos sólidos e, geralmente, apresentam colônias de crescimento vertiginoso e densa distribuição. Nesta classe, destacam-se fungos do gênero *Aspergillus* spp. que são facilmente encontrados na natureza, principalmente em solos onde há decomposição de material orgânico, em regiões de clima tropical e subtropical (Ractz, 2015).



Figura 1: Fungo *Aspergillus terreus* VSP-22, cultivado em meio PDA. Fonte: O autor.

Após obtenção das enzimas por meio da fermentação de microrganismos, as enzimas produzidas precisam ser submetidas às técnicas de extração e purificação, a fim de eliminar impurezas que comprometem a sua aplicação. A extração por sistema bifásico aquoso (SBA) é uma das mais utilizadas, sendo composta por duas fases aquosas total ou parcialmente miscíveis, que são formadas pela mistura de dois polímeros (Barros, 2009), geralmente polietileno (PEG) e dextrana, e/ou sais orgânicos (Oliveira, 2006). Essa técnica de purificação, é biodegradável e de composição atóxica, permite a aplicação em larga escala e possui baixo custo (Murari, 2016).

A tecnologia do sistema bifásico aquoso permite a integração da extração, concentração e purificação parcial da enzima em um único método. É formado por cerca de 65-90% de concentração aquosa, fornecendo um ambiente biocompatível para as biomoléculas, o que garante pouca desnaturação proteica durante o processo, além de fornecer separação seletiva. Outra importante vantagem é a baixa tensão interfacial do SBA que permite facilidade de mistura, e maior transferência de massa (Gimenes, 2018; Bittencurt, 2018).

1.1. Enzimas

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores, que atuam diminuindo o tempo necessário para que uma reação química ocorra. Algumas reações na ausência delas seriam mais longas que a idade do universo (Jiménez-Muñoz et al., 2020). A capacidade catalítica foi evidenciada no final do século XVII, e na década de 30, enzimas de origem vegetal como a pepsina, tripsina e várias outras foram identificadas pelo método de cristalografia. Tal método permitiu identificar que essas biomoléculas são proteínas, exceto as RNAs catalíticas (Cavacante et al., 2021).

As enzimas possuem quatro estruturas: a estrutura primária caracterizada pela união de aminoácidos por meio de ligações peptídicas; estrutura secundária que possui ligações de hidrogênio entre os aminoácidos, resultando numa conformação denominada alfa-hélice; estrutura terciária, formada a partir das interações de ligações covalentes e não covalentes entre as cadeias laterais de aminoácidos, o formato proveniente dessas interações é nomeado folha-beta e estrutura quaternária duas ou mais cadeias polipeptídicas unidas por ligações não covalentes, observando-se estruturas alfa-hélice e folhas-beta (Cavacante et al., 2021).

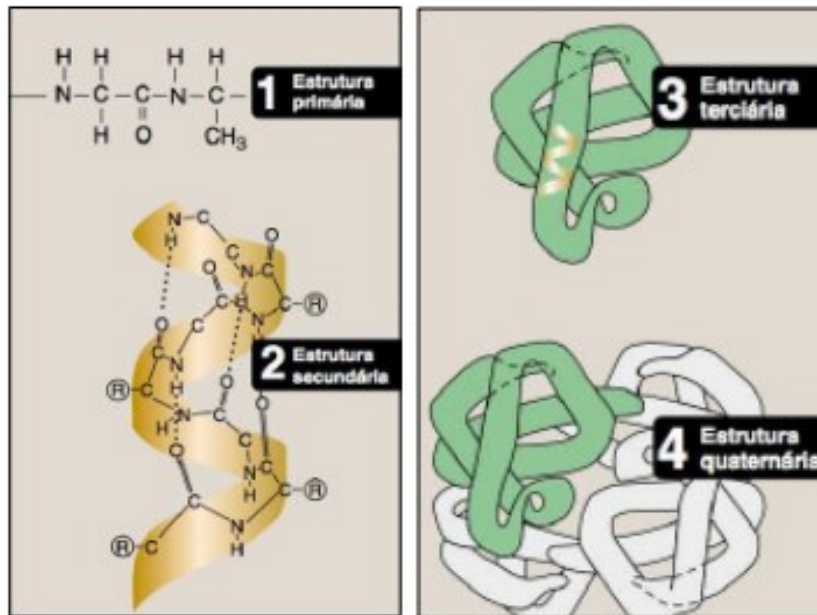


Figura 2: Níveis estruturais proteicos. Fonte: Cavacante et al., 2021.

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology - IUBMB, classifica enzimas em sete classes:

- 1) Oxirredutases – catalisam reações redox. A catalase, que possui importante aplicação industrial, é um exemplo dessa classe (Jiménez-Muñoz et al., 2020; Souza et al., 2021);

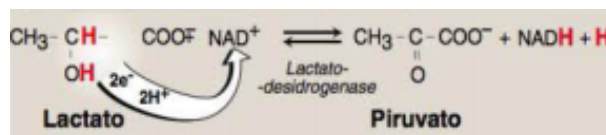


Figura 3: Exemplo mecanismo de ação da oxirredutase. Fonte: Cavacante et al., 2021.

- 2) Transferases – catalisam a transferência de grupos de átomos, tais como amina, carboxil, metil, acil, glicosil, fosforil, grupos nitrogenados, contendo fósforo (P), selênio (Se), enxofre (S), molibdênio (Mo) e tungstênio (W) (Cavacante et al., 2021; Jiménez-Muñoz et al., 2020). A enzima metiltransferase é um exemplo dessa classe (Souza et al., 2021);

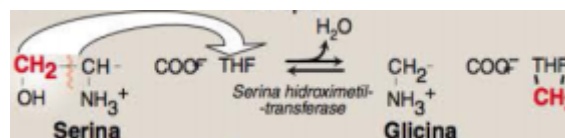


Figura 4: Exemplo mecanismo de ação das transferases. Fonte: Cavacante et al., 2021.

- 3) Hidrolases – por meio da adição de água, essa classe catalisa reações de estér, éter, ligações peptídicas e de haletos. Além de ligações C-C, P-N, S-N, C-P, S-S e C-S

(Cavacante et al. 2021). As lipases e proteases são enzimas hidrolases, e possuem ampla aplicação industrial (Souza et al., 2021);



Figura 5: Exemplo do mecanismo de ação da classe hidrolase. Fonte: Cavacant et al., 2021.

- 4) Liases – catalisam a clivagem entre as ligações C-C, C-S e C-N (Jiménez-Muñoz et al., 2020). A descarboxilase é um exemplo dessa classe (Souza et al., 2021);

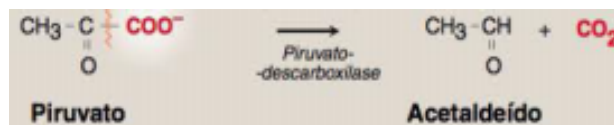


Figura 6: Exemplo do mecanismo de ação das liases. Fonte: Cavacante et al., 2021.

- 5) Isomerases – realizam interconversão entre isômeros ópticos ou geométricos (Jiménez-Muñoz et al., 2020). A enzima cis trans isomerase pertence a essa classe, e converte forma cis e trans (Souza et al., 2021);

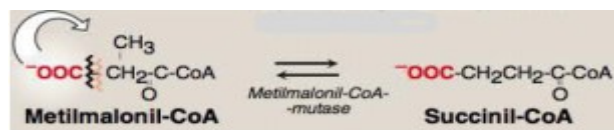


Figura 7: Exemplo do mecanismo de ação das isomerases. Fonte: Cavacante et al., 2021.

- 6) Ligases – catalisam ligações entre o carbono e carbono, e outros elementos incluindo: oxigênio, enxofre e nitrogênio (Cavacante et al., 2021). A sintetase é um exemplo dessa classe (Souza et al., 2021);

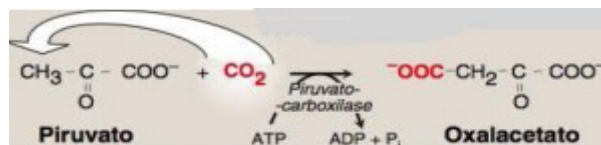


Figura 8: Exemplo do mecanismo de ação das ligases. Fonte: Cavacante et al., 2021.

- 7) Translocases – atuam catalizando a translocação de cátions e ânions inorgânicos, aminoácidos e peptídeos, carboidratos e seus derivados, dentre outros compostos (Cavacante et al., 2021);

1.1.1. Enzimas microbianas

A atividade metabólica dos microrganismos, contribuiu ao longo dos anos para a transformação da atmosfera, e isso permitiu o surgimento e evolução de organismos multicelulares complexos, plantas e animais superiores, além de formas de vida anaeróbias. Os microrganismos podem se adaptar em diferentes ambientes, tais como os que fornecem baixas concentrações de nutrientes e atividade de água, temperaturas extremas, e também são capazes de suportar uma ampla faixa de pH (Oliveira, 2017).

As enzimas obtidas a partir de microrganismos possuem ampla aplicação na indústria de alimentos, não apenas para melhoria do processo de produção, mas também no sabor, aroma, cor, textura, aparência, vida de prateleira, dentre outros (Rigo et al., 2021). O mercado global dessas biomoléculas, no ano de 2018 foi avaliado em aproximadamente US\$5,6 bilhões, estimando-se um aumento anual de 4,9%, e sendo projetado um rendimento de cerca de US\$ bilhões para 2023 (Gimenes et al., 2021).

A Tabela 1, apresenta as enzimas obtidas de fonte microbiana, além de suas aplicações na indústria de alimentos:

Tabela 1: Aplicações de enzimas microbiana na indústria de alimentos

Enzima microbiana	Aplicação	Fonte
Alfa- amilase	Sacarificação do amido	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
		<i>Bacillus stearothermophilus</i>
		<i>Bacillus licheniformis</i>
Glucoamilase	Produção de cerveja, Melhoria da qualidade do pão, Xaropes com alto teor de glicose e frutose	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Aspergillus awamori</i>
		<i>Rhizopus oryzae</i>
Protease	Amaciamento da carne, fabricação de cerveja, Coagulação do leite, Melhoria da qualidade do pão	<i>Aspergillus usarii</i>
Lactase (β -galactosidase)	Redução da intolerância à lactose em pessoas, Ingredientes alimentares prebióticos	<i>Kluyveromyces lactis</i>
		<i>Kluyveromyces fragilis</i>

Enzima microbiana	Aplicação	Fonte
Lipase	Desenvolvimento de sabor de queijo, Produção de queijo cheddar e Camembert	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Aspergillus oryzae</i>
		<i>Penicillium camemberti</i>
Fosfolipase	Desenvolvimento do sabor do queijo, Produção de gordura do leite lipolisado	<i>Fusarium oxysporum</i>
Esterase	Aumento de sabor e fragrância em suco de fruta,	<i>Bacillus licheniformis</i>
	Desesterificação de fibra alimentar, Produção de ésteres de sabor de cadeia curta	
Xilanase	Clarificação de suco de frutas, Melhoria da qualidade da cerveja	<i>Streptomyces</i> sp.
		<i>Bacillus</i> sp.
		<i>Pseudomonas</i> sp.
		<i>Aspergillus</i> sp.
		<i>Fusarium</i> sp.

Penicillium sp.

Enzima microbiana	Aplicação	Fonte
Glicose oxidase	Melhoria do prazo de validade dos alimentos, Melhoria do sabor dos alimentos	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Penicillium glaucum</i>
		<i>Penicillium adametzii</i>
Laccase	Remoção de polifenóis do cozimento do vinho	<i>Funalia trogii</i>
		<i>Bacillus licheniformis</i>
Catalase	Conservação de alimentos (com glicose oxidase), Remoção de peróxido de hidrogênio do leite antes da produção de queijo	<i>Aspergillus niger</i>
		<i>Micrococcus luteus</i>
		<i>Bacillus maroccanus</i>
Peroxidase	Desenvolvimento de sabor, cor e qualidade nutricional dos alimentos	<i>Pyrobaculum calidifontis</i>
		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>

Enzima microbiana	Aplicação	Fonte
α -acetolactato desidrogenase	Encurtando a maturação da cerveja	<i>Brevibacillus brevis</i>
Enzimas debittering – naringinase	Remoção do sabor amargo em suco de fruta. Intensificação do aroma do vinho	<i>Aspergillus niger</i> <i>Burkholderia cenocepacia</i> <i>Thermomicrobium roseum</i>

Fonte: Adaptado de Raveendran et al., 2018.

1.2. Proteases

Dentre as enzimas microbianas, as proteases possuem importante relevância, e representam cerca de 60% do mercado mundial de enzimas e destacam-se pelo potencial em degradar substratos ricos em proteínas. Elas atuam catalisando a reação de hidrólise da cadeia polipeptídica gerando aminoácidos e cadeias polipeptídicas menores (Oliveira, 2017). Estima-se que a demanda e aplicação das enzimas nas indústrias aumente à medida que pesquisas forneçam novas aplicações das mesmas (Raveerdran et al., 2018).

Quanto ao local de clivagem na cadeia polipeptídica, as proteases são divididas em: exopeptidases – atuam nas extremidades das cadeias, e as endopeptidases – atuam em regiões aleatórias da parte interna da cadeia de aminoácidos. Quanto ao resíduo catalítico presente no sítio ativo, as endopeptidases são classificadas em: serina, aspártico, cisteína, metalo, ácido glutâmico e protease treonina (Raveerdran et al., 2018).

As proteases também podem ser classificadas quanto ao seu pH ótimo, ou seja, a faixa de pH que permite melhor atividade enzimática. As proteases neutras atuam em faixa de pH neutro, e na indústria de alimentos são aplicadas com objetivo de reduzir o amargor, após a hidrólise de ligações peptídicas envolvendo aminoácidos hidrofóbicos. As proteases ácidas são endopeptidases que atuam melhor em pH ácido, são aplicadas nas indústrias de alimentos, bebidas e medicamentos. Já as proteases alcalinas são efetivas em pH alcalino, com aplicação nas indústrias de detergente, couro, farmacêutica e alimentos (Manfredini, 2020).

Como exemplos importantes de proteases, temos a bromelina a qual é extraída do abacaxi. A bromelina é um conjunto de enzimas proteolíticas encontradas nos vegetais da família Bromilaceae, a aplicação dessa enzima nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, são baseadas na sua atividade proteolítica. Algumas das principais aplicações são no amaciamento

de carnes, na clarificação de cervejas, pré-tratamento de soja, preparo de colágeno hidrolisado, entre outros (Vieira et al., 2020).

A pepsina é um importante exemplo de protease de origem animal, pois destaca-se pela aplicação industrial, encontrada principalmente no suco gástrico de todos os vertebrados, mas também em pequenas quantidades no sangue, urina e músculo. A pepsina obtida das vísceras de peixes é aplicada para produção de colágeno, e a proveniente do bacalhau pode ser utilizada no processo de coagulação para produção de queijos. Além dessas aplicações, salienta-se a aplicação na medicina para regulação intestinal e produção de antisséptico bucal (Silva, 2019).

1.3. Fermentação em estado sólido.

Inicialmente, o cultivo de microrganismos utilizando a fermentação em estado sólido (FES) tinha o objetivo de produzir biomoléculas de interesse industrial. Porém, a partir dos anos 70 surgiram estudos mais detalhados quanto a aplicação da técnica para produção de ração animal enriquecida com proteínas obtidas a partir da FES, que utilizam resíduos agroindustriais. Isso indicou a viabilidade dessa fermentação, associada ao uso desses resíduos (Oliveira Junior, 2018).

A fermentação em estado sólido, permite o crescimento de microrganismos em ambiente com baixa umidade, ou seja, o limitado teor de água encontra-se adsorvido ou agregado ao meio, e tal condição simula o hábitat natural de fungos selvagens, sendo propícia para o cultivo desses microrganismos. Além disso, a FES favorece a obtenção de extratos enzimáticos concentrados, baixo consumo energético, menor desperdício de água, garante maior estabilidade das enzimas quanto às variações de temperatura e pH, permitindo também a utilização de biomassa como substrato (Oliveira Junior, 2018; Dos Santos et al., 2018).

Na FES a principal biomassa utilizada são as lignocelulósicas, ela é considerada a fonte renovável mais abundante na natureza e inclui inúmeros resíduos agroindustriais, tais como

palhas, cascas, caules, farelo de trigo, resíduos de arroz e soja, serragem, resíduos de polpa e papel, dentre outros. Esses materiais são fontes ricas de carbono e outros componentes necessários para síntese de produtos e biomoléculas (Oliveira Junior, 2018; Dos Santos et al., 2018).

O Brasil possui uma grande e intensa produção agrícola, por isso gera elevada quantidade de resíduos na agroindústria, e a aplicação desses em bioprocessos e outros setores da economia contribui para diminuir os problemas ambientais. Além disso, são fontes renováveis para produção de biocombustíveis e outros produtos de interesse econômico, tais como as enzimas (Oliveira Junior, 2018; Dos Santos et al., 2018). Vale ressaltar ainda que, durante a produção de alimentos no mundo para consumo humano, cerca de um terço é desperdiçado ou perdido ressaltando, mais uma vez a importância de utilizar meios a fim de minimizar os impactos no ambiente (Manfredini, 2020).



Figura 9: Ilustração de FES utilizando o farelo de arroz como substrato para o fungo *Aspergillus terreus* VSP-22. Fonte: O autor.

A fermentação em estado sólido envolve três estágios: sólido, líquido e gasoso. A fase líquida trata-se do filme aquoso que entra em contato com as células do microrganismo, a fase

gasosa envolve os espaços entre as partículas, e a sólida é composta pelo substrato e seus nutrientes. Na fase líquida, há a difusão dos nutrientes e solutos para os microrganismos. Na gasosa, há a oxigenação e remoção do dióxido de carbono (CO₂), dissipação de calor, dispersão do vapor de água e compostos voláteis (Manfredini, 2020).

1.4. Sistemas Bifásicos Aquosos (SBA)

A etapa de purificação de biomoléculas é também denominada *downstream processes*, e pode refletir até 90% do custo total do produto final. Devido à exigência por bioprodutos com elevado grau de pureza, há um aumento na demanda de métodos de purificação eficientes. Existem inúmeras técnicas de purificação de produtos biotecnológicos, e a aplicação do produto final é que determina a seleção do método a ser empregado (Santos, 2019).

Os primeiros relatos sobre os sistemas bifásicos aquosos (SBAs) são do final do século XIX, quando Beijerinck ao misturar soluções aquosas de gelatina com ágar ou amido solúvel, observou a separação espontânea em duas fases líquidas. No início do século XX, Ostwald e Hertel observaram que a separação das fases ocorria em diferentes concentrações de diversas fontes de amido (Santos, 2017).

Em 1950, Albertsson iniciou trabalhos utilizando os SBA nos processos de partição e extração de biomoléculas, devido ao fato da água ser o principal componente dos sistemas. Cerca de trinta anos mais tarde, os sistemas foram aplicados para extração de íons, pois o uso da água como solvente garante um ambiente seguro para a separação de partículas sensíveis à desnaturação. E no ano de 2015, Souza e colaboradores aplicaram líquidos iônicos com o objetivo de purificar lipases (Junqueira, 2019; Santos, 2017).

Os SBAs são formados pela mistura de dois polímeros, um polímero e um sal (orgânico ou inorgânico), sal e um solvente orgânico, ou também por um líquido iônico e sal inorgânico.

A formação das duas fases, deve-se a miscibilidade entre as soluções dos constituintes do sistema, e das interações intermoleculares entre os mesmos. Desse modo, ao misturar essas soluções distintas, há a formação de duas fases, com diferentes composições, mas ambas em equilíbrio termodinâmico. Ao adicionar o composto a ser purificado, ele migra para uma das fases de acordo com a sua afinidade (Alves, 2020).



Figura 10: Composição do Sistema Bifásico Aquoso (SBA). Fonte: Junqueira, 2019.

Os SBAs formados por PEG-dextrana e PEG-sal são os mais aplicados na pesquisa, mas os sistemas que utilizam dextrana não são amplamente estudados em larga escala devido ao elevado custo. Por isso, destacam-se o uso de sistemas utilizando PEG e sais, que apresentam inúmeras vantagens como alta seletividade, baixa viscosidade e rápida separação das fases. No entanto, as altas concentrações de sal podem culminar na desnaturação de biomoléculas (Alves, 2020).

A partição das biomoléculas em uma das fases não está relacionada apenas às suas características como peso molecular, carga, hidrofobicidade e conformação. Mas também, depende das características dos constituintes do sistema como o sal e o polímero, e suas

propriedades físico-químicas como a massa molar do polímero, pH e presença de ligantes ao longo da cadeia do PEG (Alves, 2020).

A escolha do método de purificação SBA leva em conta suas inúmeras vantagens, como a elevada biocompatibilidade com os solutos, baixo custo, alta eficiência, capacidade de partição de biomoléculas e proteínas celulares de diferentes fontes. Além disso, também é possível destacar a facilidade de aplicação em larga escala, operação contínua, e possibilidade de integração com processos de clarificação e purificação, sendo que este último pode contribuir para aumento do rendimento e redução do custo do processo (Santos, 2019; Santos, 2017; Alves, 2020).

Outra característica relevante desse método é sua baixa tensão interfacial, e elevada concentração de água nas duas fases, o que reduz a probabilidade de desnaturação, e isso garante a manutenção da integridade da biomolécula, e conseqüentemente a preservação da sua funcionalidade. No SBA, pode-se destacar também baixa viscosidade, alta polaridade e fácil reciclagem do meio (Santos, 2017; Alves, 2020).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Produzir por fermentação em estado sólido e recuperar a protease de *Aspergillus terreus* VSP-22 por sistema bifásico aquoso PEG/fosfato de sódio.

2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a protease quanto a sua atividade em pH e temperaturas ótimas;
- Recuperar e purificar por sistema bifásico aquoso, utilizando o sistema PEG/fosfato de sódio monobásico e dibásico nas concentrações 12,15 e 18%, e PEG 2000,4000 e 6000 g/mol;
- Avaliar a capacidade da protease quanto a coagulação do leite antes da extração;

3. Materiais e Métodos

3.1. Produção da Protease e Extrato Enzimático

O fungo filamentosso, *Aspergillus terreus* VSP-22, pertence ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. A produção da enzima protease ocorreu por meio do processo de fermentação em estado sólido utilizando 10 g de farelo de arroz e 10 mL de células do fungo ressuspendidas em água pura, pelo período de 72 h, em temperatura ambiente.

O método de filtração foi utilizado para separação do extrato enzimático presente no meio de fermentação. Inicialmente, foram adicionados ao meio de cultivo 50 mililitros de água destilada, e este ficou no agitador de bancada por uma hora, a 120 rpm, em temperatura ambiente. Posteriormente, a filtração foi executada com o auxílio de uma peneira, que possibilitou a separação do meio sólido e do sobrenadante.

O extrato enzimático foi armazenado em tubos Falcon de 50 mL, em temperatura de 4°C.

3.2. Extração por Sistema Bifásico Aquoso

As proteases foram extraídas pelo método do sistema bifásico aquoso (SBA), preparado a partir de soluções anteriormente feitas de PEG 2000, 4000, 6000 (30% p/p); e sal fosfato de sódio monobásico e dibásico em diferentes concentrações. A solução tampão foi adicionada para se obter uma massa final de 5 g e, no primeiro sistema foi adicionado 0,5 mL do extrato enzimático, e no segundo o mesmo volume de água destilada.

Tabela 2: Níveis das variáveis utilizadas na extração de protease em Sistema Bifásico Aquoso.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
	2000	4000	6000
Massa Molar PEG¹ (g/mol)	12	15	18
Concentração de PEG (%)	12	15	18
Concentração de Sal (%)	12	15	18
pH	6,2	7,0	7,8

¹PEG: Polietilenoglicol

Subsequentemente, foi feita a agitação, em vórtex, que permitiu solubilizar os sais e misturar ambas as fases e, em seguida os sistemas foram agitados a 7.000 rpm por 10 minutos, para visualizar a separação das fases por meio da decantação. Em cada fase foram mensurados os volumes das fases superior e inferior. Além disso, as proteases de cada fase foram testadas quanto à atividade proteolítica e, também tiveram suas proteínas totais determinadas. Os resultados obtidos serão analisados no programa Statistica 10.0 (Statsoft, 2010).

3.2.1. Equações para cálculo das variáveis

As análises dos resultados foram realizadas a partir da atividade específica, fator de purificação, recuperação e rendimento. Também foram calculados os coeficientes de partição das proteases e proteínas.

A atividade específica (U/mg), foi determinada a partir da razão entre a atividade proteolítica (A), U/mL, e a concentração total de proteína (C), mg/mL presentes na amostra (Equação 1):

$$SA = \frac{A}{C}$$

O fator de purificação foi calculado a partir da razão entre a atividade específica da fase superior (SA_T) e atividade específica do extrato enzimático (SA_{EX}) (Equação 2):

$$FP = \frac{[SA]_T}{[SA]_{EX}}$$

A recuperação foi determinada a partir da razão entre a atividade proteolítica das proteases recuperadas (A_R) e, atividade proteolítica da protease do extrato enzimático (A_{EX}) (Equação 3):

$$R(\%) = \frac{A_R}{A_{EX}} \times 100$$

O rendimento foi definido por meio da razão entre a concentração das proteínas totais recuperadas (C_R) e as proteínas totais presentes no extrato enzimático (C_{EX}) (Equação 4):

$$Y(\%) = \frac{C_R}{C_{EX}} \times 100$$

O rendimento da extração por meio do SBA será definido a partir do volume da fase, superior ou inferior, na qual as proteínas são extraídas (V_x) e, também por meio da sua concentração nessa mesma fase (C_x). As variáveis V_{TO} e C_{TO} são referentes ao volume e concentração proteica total no sistema, respectivamente (Equação 5):

$$n(\%) = \frac{100}{\left(\frac{V_x \times C_x}{V_{TO} \times C_{TO}}\right)}$$

O coeficiente de partição da enzima foi calculado a partir da razão de atividade da protease na parte superior (A_T) e a inferior (A_B) (Equação 6):

$$\text{Log } K_a = \frac{A_T}{A_B}$$

O coeficiente de partição das proteínas foi estimado a partir da relação entre a concentração de proteínas da fase superior (C_T) e, a concentração na fase inferior (C_B) (Equação 7):

$$\text{Log } K_p = \frac{C_T}{C_B}$$

3.3. Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada a partir da solução de 125 uL de azocaseína a 1% em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, juntamente com 125 uL da amostra

durante 15 minutos a 37 °C (Charney e Tomarelli, 1947). Após o término do tempo de incubação, foram adicionados 750 uL da solução de ácido tricloro acético (TCA) 5%, em seguida a amostra foi centrifugada a 7.000 rpm por 5 minutos, em temperatura ambiente.

Posterior a centrifugação, foi adicionado ao sobrenadante 1 mL da solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,5M, e as leituras da absorbância realizadas a 440 nm. A atividade proteolítica foi expressa em unidades de atividade enzimática (U). Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzimas necessárias para provocar um aumento de 1 densidade óptica, em uma hora.

3.4. Determinação de Proteínas Totais

O método utilizado para indicar as concentrações totais de proteínas foi o ensaio de Bradford (1976), no qual 20 uL de amostra e 1 mL do reagente Bradford foram incubados por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, a leitura no espectrofotômetro foi realizada a 595 nm.

3.5. Teste de Coagulação do Leite

A atividade de coagulação do leite foi realizada a partir da solução composta por 2,5 mL da solução de leite em pó desnatado 10%, suplementado com CaCl₂ na concentração 0,04 mol/L. Feito isto, a solução ficou 10 minutos no banho termostático a uma temperatura de 35°C. Em seguida, 0,25 mL do extrato enzimático foi adicionado aos tubos que continham a mistura reacional. Assim, ocorreu a formação de coágulos no tubo e, a partir disso, foi determinado o tempo em que se formaram as primeiras partículas.

Foi definida uma unidade de coagulação do leite (MCU), para caracterizar a quantidade de enzima necessária para coagular 1 mL do substrato em 40 minutos a 35°C. O cálculo foi feito pela fórmula: $MCU = 2400 / t \times S / E$; onde t é o tempo necessário para a formação do coágulo, S é o volume do leite, e E o volume da enzima (Silva et al., 2014).

3.6. Caracterização da Protease

3.6.1. pH Ótimo

Para determinação do pH ótimo, ou seja, o pH que permite a melhor atividade da protease, foram preparadas soluções tampão citrato-fosfato, fosfato de sódio e TRIS-HCL com os pHs variando entre 5,0; 6,6; 7,4 e 8,2. Todas as soluções tampão foram de 0,1M.

3.6.2. Temperatura Ótima

Para definir a temperatura ótima, ou seja, a temperatura que permite melhor desempenho da protease, foi utilizado o teste da atividade proteolítica para análise, no qual as enzimas foram incubadas com 125uL de solução azocaseína 1% por 15 minutos nas temperaturas 15, 25, 35 e 45°C.

4. Resultados e Discussão

4.1. Avaliação da Extração da Protease utilizando Sistema Bifásico Aquoso PEG/fosfato de sódio

Na tabela 3, são apresentados todos os dados obtidos para os parâmetros fator de purificação, recuperação, rendimento da extração, Log K_a e K_p . Os resultados adquiridos por meio do método do SBA mostram que foi possível realizar a etapa da extração da protease e, mesmo com a interferência do sal foram alcançados resultados consistentes para a pesquisa realizada.

Tabela 3: Avaliação da Extração da Protease utilizando Sistema Bifásico Aquoso PEG/fosfato de sódio.

Valores Reais						Resultados						
Run	MPEG ^a	CPEG ^b	CSal ^c	pH	V.A. ^d	Fase	A.E. ^e	F.P. ^f	R ^g	n ^h	Log Ka	Log Kp
1	2000	12	12	6,2	050	UP	531,46	252,63	13,17	0,10	- 0,07	-2,48
						BP	1,01	0,48	15082	31,27		
2	6000	12	12	6,2	0,50	UP	28800	17228,42	10,24	0,00	-0,28	-2,56
						BP	59,80	35,77	19,67	0,90		
3	2000	18	12	6,2	0,50	UP	12480	7789,144	4,57	0,00	4,14	0,30
						BP	0,90	0,56	0,00	0,00		
4	6000	18	12	6,2	0,50	UP	19296	12711,95	7,19	0,00	-0,46	-2,68
						BP	66,49	43,80	21,20	0,97		
5	2000	12	18	6,2	0,50	UP	195,35	145,85	45,30	2,33	5,10	1,15
						BP	0,00	0,00	0,00	0,16		
6	6000	12	18	6,2	0,50	UP	89376	52794,49	0,00	0,00	4,99	0,39
						BP	0,9	0,53	31,69	0,00		
7	2000	18	18	6,2	0,50	UP	71904	34243,54	29,04	0,00	4,90	0,40
						BP	0,90	0,42	0,00	0,00		
8	6000	18	18	6,2	0,50	UP	51,14	37,08	8,30	1,43	4,38	3,10
						BP	0,90	0,65	0,00	0,00		
9	2000	12	12	7,8	0,50	UP	7570,28	3605,27	14,26	0,00	1,61	-1,58
						BP	0,34	1,06	0,34	0,27		
10	6000	12	12	7,8	0,50	UP	53568	31960,22	18,76	0,00	0,35	-2,43
						BP	36,40	21,72	8,30	0,59		
11	2000	18	12	7,8	0,50	UP	502,90	300,84	15,74	0,14	-0,07	-0,87
						BP	57,31	34,28	18,92	1,09		
12	6000	18	12	7,8	0,50	UP	19296	12101,45	7,27	0,00	-0,38	-2,76

Valores Reais						Resultados						
Run	MPEG ^a	CPEG ^b	CSal ^c	pH	V.A. ^d	Fase	A.E. ^e	F.P. ^f	R ^g	n ^h	Log Ka	Log Kp
						BP	46,00	28,84	17,78	1,09		
14	6000	12	18	7,8	0,50	BP	0,9	0,59	0,00	0,00		
						UP	37,86	23,74	20,06	2,81	4,77	3,43
15	2000	18	18	7,8	0,50	BP	0,9	0,56	0,00	0,00		
						UP	400,06	290,14	26,00	0,45	0,61	2,57
16	6000	18	18	7,8	0,50	BP	16608	12045,07	6,30	0,00		
						UP	44640	23053,35	19,01	0,00	4,69	0,30
17	4000	15	15	7,0	0,50	BP	0,9	0,00	0,00	0,00		
						UP	26112	15620,43	9,28	0,00	-0,29	-2,41
18	4000	15	15	7,0	0,50	BP	69,07	41,32	18,13	0,07		
						UP	35712	22288,93	13,08	0,00	-0,14	-2,18
19	4000	15	15	7,0	0,50	BP	113,52	70,85	18,08	0,41		
						UP	39,36	23,54	13,01	2,51	-0,10	0,67
20	4000	15	15	7,0	0,50	BP	70,68	42,28	16,46	0,23		
						UP	956,57	565,04	9,49	0,07	-0,30	-0,84
						BP	97,68	57,70	19,10	0,52		

UP-fase superior do SBA; BP-fase inferior do SBA; ^aMassa molar do PEG; ^bConcentração de PEG; ^cConcentração de fosfato de sódio; ^dVolume da amostra; ^eAtividade específica (U/mg); ^fFator de purificação; ^gRecuperação (%); ^hRendimento da extração (%).

Os maiores resultados obtidos para Log K_p apresentados na tabela 3 foram 3,43; 3,10 e 2,57 referentes aos sistemas 14, 8 e 15, respectivamente, altos valores para esse parâmetro indicam que as proteínas totais particionaram preferencialmente na fase superior do SBA. Foi possível observar que o aumento da massa molar do polímero de 2000 para 6000 influenciou no aumento de tais resultados. Nascimento e colaboradores (2020), confirmou em sua pesquisa que além da porcentagem, o aumento da massa molar de PEG também reflete no aumento do valor de K_p.

As proteases particionaram majoritariamente na fase superior, região rica em PEG, onde o Log K_a é positivo. Tal resultado deve-se ao efeito do sal que é presente em alta concentração na fase inferior do sistema. Contudo, o resultado também pode ser devido a maior afinidade da enzima por um ambiente hidrofóbico, que encontrado na fase rica em PEG, o que indica uma biomolécula apolar (Gimenes, 2018).

Gimenes (2018), encontrou resultados de partição semelhantes para a extração de protease por meio de SBA PEG/sulfato de amônio, utilizando o mesmo microrganismo dessa presente pesquisa. De Sena e colaboradores (2017), realizou a purificação de tanase de *Aspergillus tamaritii* URM 7115 por meio do SBA PEG/Citrato e as enzimas também particionaram preferencialmente na fase superior, rica em PEG.

Segundo Wu e colaboradores (2017) a presença de sal em um sistema que contém polímero propicia uma distribuição desigual dos íons e, por isso pode ser criado uma diferença de potencial entre as fases superior e inferior do SBA que por sua vez influencia na partição das enzimas. Esse autor constatou que a diferença entre a hidrofobicidade e o potencial interfacial entre as fases reforçou o efeito do sal, o qual favoreceu a partição da bromelina na fase superior.

Segundo a Tabela 3, os sistemas 5, 6, 7 e 15 forneceram os melhores valores para recuperação da enzima sendo 45,30; 31,69; 29,04 e 26%, respectivamente. Todos os resultados

foram obtidos na fase superior do sistema e, possuem em comum a máxima concentração de sal de 18%. Os dois melhores resultados, provenientes dos sistemas 6 e 7, possuem além da concentração de sal, o mesmo valor de pH, 6,2.

Wu e colaboradores (2017), em sua pesquisa utilizando o sal NaCl no SBA PEG/NaCl também obteve maior índice de recuperação da bromelina que particionou na fase superior quando houve aumento da concentração do sal de 1 para 5%. O trabalho de Gimenes (2018), assim como esta pesquisa atingiu altos resultados para recuperação da enzima quando esta foi submetida a máxima concentração de sal.

Quanto ao fator de purificação, alguns sistemas forneceram altos valores que não eram esperados, as possíveis hipóteses para tais resultados é a interferência do sal. No decorrer dos testes, foi observado precipitação ou formação de cristais de sal nos sistemas durante a etapa que incluía o uso do vórtex para solubilizar os constituintes do SBA. Nestes o tempo necessário para obter a completa solubilização foi superior quando comparado aos sistemas que não apresentaram a mesma situação.

Por isso, foi selecionado, apenas, os resultados dos SBAs que durante a execução da pesquisa permitiram conferir visualmente que não houve excedente do sal e dificuldade para solubilizá-los. Ao analisar tais sistemas, não foi possível estabelecer um padrão da interferência dos mesmos, pois os resultados inconsistentes foram encontrados em concentrações baixas (12%) e altas (18%) de fosfato de sódio.

O fator de purificação é calculado utilizando a atividade específica e, o cálculo dessa última é determinada por meio dos valores de absorvância obtidos a partir dos testes de atividade proteolítica e determinação de proteínas totais. Os erros experimentais foram observados no teste proteolítico, em que foram obtidos resultados superestimados durante a análise das amostras, logo os demais cálculos realizados a partir deste teste forneceram resultados inconsistentes.

Os máximos resultados obtidos para o fator de purificação foram 70,85; 57,70 e 43,80 vezes, nas fases inferiores dos sistemas 18, 20 e 4, respectivamente. Os dois maiores valores compõem a categoria dos sistemas centrais e, possuem em comum todos os parâmetros. Ainda na mesma categoria, no sistema 19, foi encontrado o quarto melhor índice referente ao fator de purificação, 42,28 vezes.

Lario e colaboradores (2016), purificou a protease proveniente da *Rhodotorula mucilaginosa* L7 por meio do SBA PEG/ Citrato de Sódio e Tartarato de Sódio e, utilizou as mesmas massas molares de PEG dessa presente pesquisa. Ao avaliar a interferência do sal na determinação da atividade enzimática pelo método da azocaseína, encontrou que nos sistemas compostos por PEG com peso molecular acima de 4000 não houve interferência significativa dos resultados, pois houve exclusão não específica do polímero da superfície da proteína e um efeito estabilizador na estrutura.

Tal resultado, coincide parcialmente com os obtidos nessa pesquisa e, explica os resultados inconsistentes nos sistemas compostos por polímero com massa molar inferior, enquanto os resultados dos sistemas que possuíam PEG 6000 podem possivelmente ter sido influenciados pela alta concentração de fosfato de sódio (18%).

Quanto a avaliação do rendimento da protease, o melhor resultado, 31,37%, foi obtido no sistema 1, composto pela menor massa molar de PEG, 2000, menores concentrações do polímero e sal, e o menor valor para pH, sendo 12%, 12% e 6,2, respectivamente. De Sena e colaboradores (2017), confirmou que o aumento desses parâmetros reflete em menores resultados para recuperação da tanase proveniente de *Aspergillus tamarii* URM 7115, resultados que corroboram com o deste presente trabalho.

4.2. Atividade Proteolítica frente à Coagulação do Leite

Primeiramente, foi analisada a influência do cloreto de cálcio (CaCl_2) sobre a atividade de coagulação do leite. A Figura 11, mostra a influência do aumento da concentração de cloreto de cálcio no teste da atividade de coagulação do leite. É possível observar que a atividade de coagulação é crescente de acordo aumento da concentração de CaCl_2 , e que na concentração 0,04 mol/L de CaCl_2 atinge 64,343 MCU. Em seguida, nota-se diminuição da atividade de coagulação.

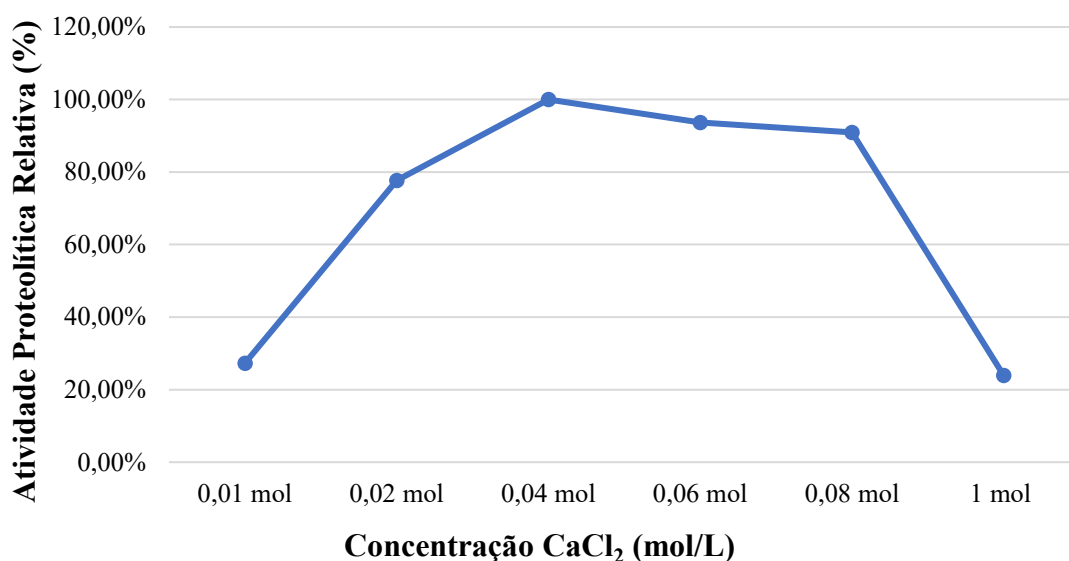


Figura 11: Efeito da variação da concentração de CaCl_2 na atividade de coagulação do leite.

O cálcio é descrito como uma substância importante para a coagulação do leite, pois é capaz de criar condições isoelétricas e formar pontes entre as micelas da caseína. O aumento da concentração de cálcio reflete no aumento da coagulação, devido a neutralização dos resíduos negativos das micelas da caseína (grupos fosfoserina e carboxílicos) por meio dos complexos Ca^{2+} e cálcio-fosfato. Assim, a adição da concentração adequada garante além da redução do tempo de coagulação, o aumento da firmeza da coalhada (Merheb-Dini et al., 2010).

A atividade máxima de coagulação do leite foi na concentração 0,04 mol/L de CaCl_2 corroborando com os trabalhos de Merheb-Dini e colaboradores (2010) e Silva colaboradores (2014), que relataram maior atividade proteolítica relativa utilizando a mesma concentração de

CaCl₂ para as proteases obtidas do fungo *T. indiciae-seudaticae* N31. Os pesquisadores Sato e colaboradores (2018) e Slamani e colaboradores (2018), apresentaram maior atividade proteolítica relativa nas concentrações 0,05 mol/ L de CaCl₂.

A partir da concentração 0,06 mol/L a atividade de coagulação decresce e, segundo Freitas e colaboradores (2016), as altas concentrações desse sal pode reduzir o pH do leite, resultando em menor taxa de agregação e inativação proteolítica. Merheb-Dini e colaboradores (2010), também comprovaram que a atividade de coagulação diminui em concentrações superiores a 0,04 mol/L de CaCl₂, uma vez que tal efeito ocorre devido ao aumento da força iônica ou saturação de resíduos negativos das micelas.

4.3. Caracterização da protease

4.3.1. Efeito do pH sobre a Atividade Proteolítica

A influência da variação do pH no desempenho catalítico da protease foi avaliado nos valores de pH 5,0; 6,6; 7,4 e 8,2 a 37°C, e em seguida foi realizada a atividade proteolítica. A estabilidade da enzima após purificação pelo SBA é apresentada na Figura 12, pode-se observar que a sua atividade é crescente até atingir o ponto máximo no pH 7,4. Em seguida, há um pequeno declínio da sua atividade, no pH 8,2.

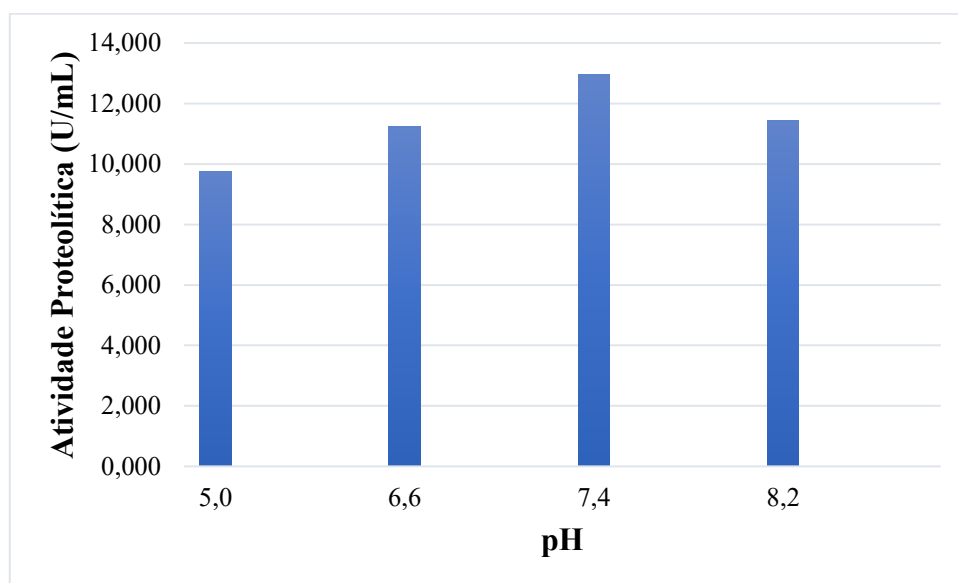


Figura 12: Efeito da variação do pH na atividade proteolítica da enzima.

A menor atividade proteolítica, 9,74 U/mL, foi encontrada no pH 5, o mais ácido da faixa selecionada. Tal resultado, deve-se a influência do pH na estrutura da enzima, que atua alterando a sua conformação, alterando também seu sítio catalítico, o que reflete no desempenho enzimático (Da Silva et al., 2019). Alam e colaboradores (2018), também confirmaram que o ambiente ácido atenua a ação da atividade catalítica da protease.

Os melhores resultados, 12,94 U/mL e 11,43 U/mL, refere-se aos pHs 7,4 e 8,2, respectivamente, o que indica que a enzima é de fato uma protease (Gimenes, 2018). Os resultados encontrados nesta pesquisa são análogos aos de Gimenes (2018), que confirmou melhores resultados até o pH 8 para a protease do microrganismo *Aspergillus terreus*, VSP-22. Da Silva e colaboradores (2019), encontraram resultados semelhantes ao do presente trabalho, indicando que a faixa até o pH 7,5 permite melhor desempenho da protease.

Kumar e colaboradores (2017), confirmaram que o pH é um parâmetro importante que interfere diretamente na atividade proteolítica das enzimas, que atuam melhor nas condições que atendem as características da classe à qual pertencem, ou seja, enzimas com perfil neutro atuam melhor na faixa de pH entre 7 e 7,5. Sendo assim, é possível sugerir que a enzima alvo deste estudo pertence à classe das proteases neutras, pois atingiu maior atividade catalítica no pH 7,4.

4.3.2. Efeito da temperatura frente à Atividade Proteolítica

A influência da elevação da temperatura na protease no estado bruto, ou seja, antes da purificação foi avaliada a fim de caracterizá-la e, assim, encontrar um padrão que forneça um ambiente que potencialize a sua atividade catalítica. Para a realização do estudo da temperatura ótima, foi determinado o pH 7 como ideal, em seguida foram selecionadas temperaturas entre 15 a 45°C, com intervalos de 5°C. Logo, as amostras foram submetidas a atividade proteolítica.

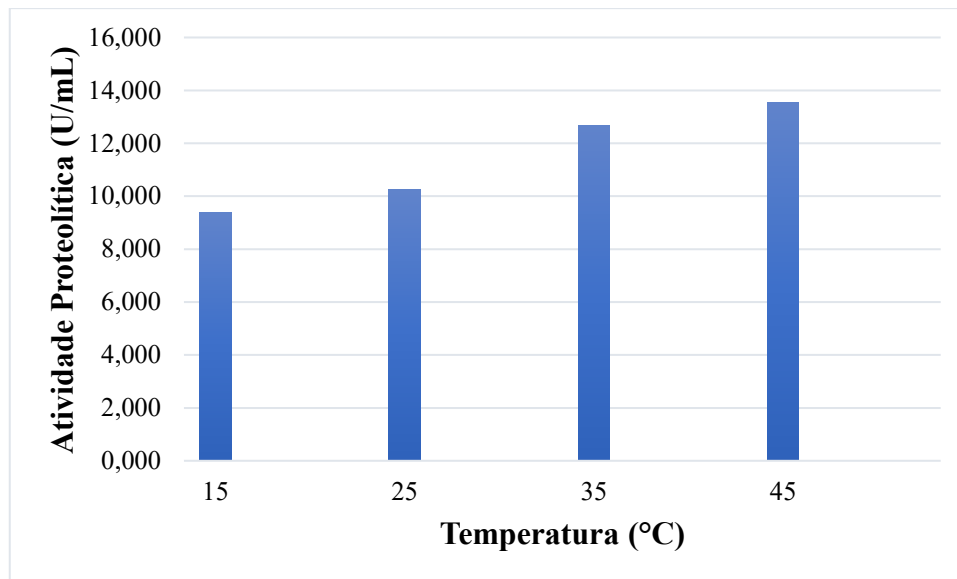


Figura 13: Efeito da variação da temperatura na atividade proteolítica da enzima.

A temperatura é um fator crucial para o desempenho das proteases, por isso seus efeitos são claramente vistos e, a sua diminuição afeta diretamente a taxa de reação da enzima (Kumar et al., 2017). A enzima quando incubada a 15°C, fornece o menor valor para atividade proteolítica, 9,39 U/mL, isso demonstra que ela não foi capaz de realizar plenamente sua ação catalítica.

Conforme há elevação da temperatura, a ação catalítica também é potencializada (Kumar et al., 2017). Nas temperaturas 35 e 45 °C são encontrados os melhores resultados para atividade proteolítica, 12,69 U/mL e 13,54 U/mL, respectivamente. Da Silva e colaboradores (2019), encontram resultados semelhantes, onde a protease de *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 atingiu picos máximos nas temperaturas entre 30 e 45°C.

Segundo Gimenes (2018), as proteases provenientes de *Aspergillus terreus* VSP-22 apresentam ampla faixa de temperatura, que variam entre 35 a 55°C. Além disso, este mesmo trabalho também sugeriu que a enzima não é estável a altas temperaturas, pois 20 minutos de incubação a temperaturas superiores a 45°C propiciaram sua inativação.

5. Conclusão

Por meio desta pesquisa, foi possível obter a protease de *Aspergillus terreus* VSP-22 por meio da fermentação em estado sólido. A partir do extrato enzimático foram realizados testes de purificação pelo SBA que permitiu obter 31,69% da enzima purificada, além de um fator de purificação que atingiu o máximo de 70,85 e, rendimento de 31,37%. As enzimas particionaram preferencialmente na região superior do sistema, como pode ser observado pelos valores positivos de Log Ka.

Quanto ao teste de atividade de coagulação do leite, a enzima no seu estado bruto mostrou-se capaz de realizar a coagulação com eficiência e, o melhor desempenho foi obtido no meio reacional que continha 0,04 mol/L de CaCl₂. Os ensaios para caracterização parcial da enzima permitiram definir o pH 7,4 e a temperatura de 45°C como melhores parâmetros que potencializaram a ação catalítica da biomolécula alvo do estudo.

Tais resultados contribuem positivamente para uma futura aplicação industrial da protease, uma vez que é possível produzir satisfatoriamente enzimas proteolíticas a partir de um resíduo agroindustrial (farelo de arroz). Além disso, os testes de aplicação da enzima para coagulação do leite mostraram-se promissores. Todo o trabalho realizado evidencia a utilização e importância das técnicas biotecnológicas na pesquisa.

6. Referências Bibliográficas

ALAM, A.; PRAKASH, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, V.; SAXENA, J.; YADAV, B. Partial purification and characterization of protease enzyme from soil-borne fungi. **Mycopath**, v. 14, n. 1&2, 2018.

ALVES, A. N.. Extração de protease de Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata Miller*) e purificação parcial em sistemas aquosos bifásicos formados por PEG + fosfato de sódio + água. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos.2020.

BARROS, K.V.G. Caracterização e purificação da enzima bromelina derivada do curaua (*Ananas erectifolius*) em sistema bifásico aquoso PEG/fosfato. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 2009.

BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BITTENCURT, N. M.. Produção, caracterização bioquímica e purificação de lipases de *Metschnikowia* sp. prospectos do ambiente Antártico utilizando sistema bifásico aquoso. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 2018.

CAVACANTE, T. D. X; DE MELO, F. A.; SANTOS, L. A.; JUNIOR, O. B.; BRANDÃO, L. G.. Enzimas: estrutura, nomenclatura e classificação. Centro Paula Souza, Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. 2021.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R. M.. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 171, p. 501- 505, 1947.

DA SILVA, I. H. S.; NOGUEIRA, J. P.; DUTRA, R. P.; DE FRETIAS, A. C.. Stability study of pre-purified protease obtained from *Aspergillus oryzae* NRRL 1911 by solid state fermentation with canola cake as substrate at different pH and temperature. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18538-18552, 2019

DE SENA, A. R.; BARROS, F. M. O.; CAMPOS, T. C. L.; EVARISTO, T.C.S. N.; MOREIRA, K.A.; DE ASSIS, A. S.. Application of aqueous biphasic systems as strategy to purify tannase from *Aspergillus tamaritii* URM 7115. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 9, p. 945-951, 2017.

DOS SANTOS, P.S.; SOLIDADE, L. S.; SOUZA, J. G. B.; SAMPAIO, G.; BRAGA Jr, A. C. R.; de ASSIS, F. G. D. V.; LEAL, P. L.. Fermentação em estado sólido em resíduos agroindustriais para produção de enzimas: Uma revisão sistemática. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 4, n. 2, p. 0181-0188, 2018.

FREITAS, C. D., LEITE, H. B., OLIVEIRA, J. P., AMARAL, J. L., EGITO, A. S., VAIRO-CAVALLI, S.; RAMOS, M. V.. Insights into milk-clotting activity of latex peptidases from *Calotropis procera* and *Cryptostegia grandiflora*. **Food Research International**, v. 87, p. 50-59, 2016.

GIMENES, N. C., SILVEIRA, E., TAMBOURGI, E. B.. An overview of proteases: production, downstream processes and industrial applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 50, n. 3, p. 223-243, 2021.

GIMENES, N. C.. Purificação e caracterização de protease de *Aspergillus terreus* VSP-22. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 2018.

JIMÉNEZ-MUÑOZ, E.; MONTIEL-HERNÁNDEZ, J. F.; PEÓN, A. N.; JARDÍNEZ-VERA, A. C.; LÓPEZ-PÉREZ, P.A.. Enzymes at a glance. Review Article. **Sociedad Española de Beneficencia A. C.**, v. 2, n. 2, p. 1-18, 2020.

JUNQUEIRA, C. M.. Surfactantes como agentes moduladores da partição e formadores de novos sistemas aquosos bifásicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Química. 2019.

KUMAR, L.; JAIN, S. K.. A Review on Environmental Pollution Mitigation by Fungal Proteases. **Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology**, v. 7, n. 3, p. 32-37, 2017.

LARIO, L.D.; MALPIEDI, L.P.; PEREIRA, J.F.B.; SETTE, L.D.; PESSOA-JUNIOR, A.. Liquid-liquid extraction of protease from cold-adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L7 using biocompatible and biodegradable aqueous two-phase systems. **Separation Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 57-67, 2016.

MANFREDINI, P. G.. Produção concomitante de proteases e peptídeos bioativos por fermentação em estado sólido. Dissertação de Mestrado. Universidade de Passo Fundo, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2020.

MERHEB-DINI, C., GOMES, E., BOSCOLO, M., DA SILVA, R.. Production and characterization of a milk-clotting protease in the crude enzymatic extract from the newly isolated *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Food Chemistry**, v. 120, n. 1, p. 87-93, 2010.

MURARI, G.F.. O uso de sistemas aquosos bifásicos formados por polímero PEG e sal para remoção de um surfactante aniônico de efluentes. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. 2016.

NASCIMENTO, C.O.; PEDROSA, R. M. B. C; SOARES, P.A.; HERCULANO, P. N.; PORTO, T. S.; NASCIMENTO, T. P.; SANTOS, M. T. C.. Purification of a lectin from *Cratylia mollis* crude extract seed by a single step PEG/phosphate aqueous two-phase system. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, p. 1-9, 2020.

NEVES, V. A. SOUZA, K. A. DE F.. Experimentos de Bioquímica: Enzimas. Experimentos de Bioquímica. Araraquara. Disponível em: <http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/enzimas.htm>. Acesso em: 24 out. 2021.

OLIVEIRA, D. M.. Atividade de enzimas proteolíticas de diferentes espécies microbianas. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Faculdade de Engenharia Ambiental. 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, S. D.. Produção de celulases por *Aspergillus fumigatus* através da fermentação em estado sólido e recuperação e purificação por extração micelar em duas fases aquosas. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Faculdade de Engenharia Química. 2018.

OLIVEIRA, R. M.. Phase equilibrium of aqueous two-phase systems composed by polyethyleneglycol, zinc sulphate, copper sulphate and sodium citrate at different temperatures. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2006.

PEREIRA, J. C. L.. Avaliação da produção de proteases por três fungos isolados do cerrado brasileiro. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 2017.

RACZ, J.V.B.. Produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus Niger*. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde. 2015.

RAVEENDRAN, S.; PARAMESWARAN, B.; BEEVI UMMALYMA, S.; ABRAHAM, A.; KURUVILLA MATHEW, A.; MADHAVAN, A.; PANDEY, A.. Applications of Microbial Enzymes in Food Industry. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 1, p. 16-30, 2018.

RIGO, D.; GAYESKI, L.; TRES, G. A.; CAMERA, F. D.; ZENI, J.; VALDUGA, E.; BACKES, G. T.. Microbiological Production of Enzymes: a Review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 9232-9254, 2021.

SANTOS, G. L.. Produção, purificação e caracterização parcial de protease de *Penicillium citrinum*. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. 2019.

SANTOS, R. P.. Processo integrado de extração e purificação de betanina a partir do *Opuntia ficus-indica* utilizando sistemas aquosos bifásicos à base de THF e sais sódio. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Processos. 2017.

SATO, K., GOTO, K., SUZUKI, A., MIURA, T., ENDO, M., NAKAMURA, K., & TANIMOTO, M.. Characterization of a Milk-clotting Enzyme from *Hericium erinaceus* and Its Proteolytic Action on Bovine Caseins. **Food Science and Technology Research**, v. 24, n. 4, p. 669-676, 2018.

SILVA, B. L.; GERALDES, F. M.; MURARI, C. S.; GOMES, E.; DA-SILVA, R.. Production and characterization of a milk-clotting protease produced in submerged fermentation by the thermophilic fungus *Thermomucor indicae-seudaticae* N31. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 4, p. 1999-2011, 2014.

SILVA, T. A.. Estômago dos peixes tambaqui (*Colossoma macropomum*) e xaréu (*Caranx hippos*): uma fonte de proteases ácidas industriais. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza. 2019.

SLAMANI, R., LABADI, R., BRAHIM ERRAHMANI, M., & BELLAL, M. M.. Purification and characterisation of milk-clotting and caseinolytic activities of pepsin isolated from adult sheep abomasa. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 3, p. 764-770, 2018.

STATSOFT. Statistica: data analysis software system. Tulsa: StatSoft 2010.

VIEIRA, L. M., MARTINS DA SILVA, J. R., OLIVEIRA, L. N., SOUZA, À. P. S., MORAIS, M.C.D.. Bromelina extraída do abacaxi – Uma revisão. **Revista Referências em Saúde da Faculdade Estácio de Sá de Goiás**, v. 3, n. 2, p. 53-60, 2020.

WARD, O. P.. Proteases. **In: Comprehensive Biotechnology**, n. 2, p. 571-582, 2011.

Wu, W.C.; NG, H.S.; SUN, I.M. e Lan, J.C.W.. Single step purification of bromelain from *Ananas comosus* pulp using a polymer/salt aqueous biphasic system. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 79, p. 158-162, 2017.