



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

FELYPE THOMAZ DE BRITO ROCHA

Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso
***Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo**
de café como substrato

Recife-PE

2018



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

FELYPE THOMAZ DE BRITO ROCHA

Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentososo
***Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo**
de café como substrato

Dissertação a ser apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em BIOCiência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo

Porto

Coorientador: Dr. Romero Marcos Pedrosa

Brandão Costa

Recife-PE

2018

R672p Rocha, Felype Thomaz de Brito.

Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato / Felype Thomaz de Brito Rocha. – Recife, 2018.

74 f.: il.

Orientador(a): Ana Lúcia Figueiredo Porto.

Coorientador(a): Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa.

Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2018.

Referencias.

1. Proteases
 2. *Aspergillus sydowii*
 3. Resíduo de café
 4. Fermentação em estado sólido
- I. Porto, Ana Lúcia Figueiredo, orient.
II. Costa, Romero Marcos Pedrosa Brandão, coorient.
III. Título

CDD 636.089

Felype Thomaz de Brito Rocha

Produção e purificação de protease obtida do fungo filamentoso *Aspergillus sydowii* por fermentação em estado sólido utilizando resíduo de café como substrato

Data da aprovação 19 de fevereiro de 2018

Banca examinadora

Prof. Dr. Romero Marcos Pedrosa Brandão Costa
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Raquel Pedrosa Bezerra
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Polyanna Nunes Herculano
(Departamento de Bioquímica – Faculdade São Miguel)

Prof. Dr. Vagner de Melo Oliveira
(Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE)

Recife
2018

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao Prof. Dr. Romero Brandão que disponibilizou o seu tempo para coorientar-me, pelos seus ensinamentos, estímulos e conselhos nas horas difíceis, por estimular o correr atrás de soluções promovendo o crescimento científico.

Agradeço a todos os amigos do LABTECBIO, sem essa grande família nada do que foi realizado nesse trabalho teria sido possível, aprendi e cresci muito na presença de todos vocês. Agradeço em especial a Wendel pela ajuda no dia a dia dos experimentos

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

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

Obrigado!

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

Os homens pedem a saúde para juntar dinheiro, depois gasta dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro se esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. “Vivem como se nunca fossem morrer e morrem como se nunca tivessem vivido”

(Dalai lama)

RESUMO

As proteases são um grupo de enzimas hidrolíticas, que possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas extremamente importantes para indústria, sendo seu uso correspondente a 60% das enzimas comercializadas. Devido essa importância, faz-se necessária a utilização de novas fontes de obtenção ou de novas formas de baratear a produção. Pensando nisso a utilização de resíduos agroindustrial em associação com processos fermentativos pode ser uma forma de obtenção de novas enzimas além de ajudar a combater os sérios danos ambientais causados pela eliminação desses resíduos na natureza.

A Fermentação em Estado Sólido (FES) vem como tentativa de reaproveitamento desse material que pode ser utilizado como um substrato de alta qualidade por um baixo preço para produção de proteases com potencial biotecnológico. O presente trabalho teve como objetivo utilizar *Aspergillus sydowii* para a produção de protease através da FES, além de purificar a enzima alvo através de processos de cromatográficos, bem como a determinação das características bioquímicas da protease produzida e isolada. O micro-organismo utilizado foi isolado diretamente do café e identificado. Em seguida, foi realizada uma verificação do seu potencial de produção para protease. Para a produção foram avaliados o tempo de fermentação, a umidade e a quantidade de substrato utilizada. Para o processo de purificação foram utilizadas técnicas de precipitação com acetona, colunas cromatográficas utilizando como resina a DEAE-Sephadex e gel filtração Superdex 75. Foram analisados os extratos brutos e purificados. Os extratos foram submetidas à caracterização quanto a sua termoestabilidade, temperatura e pH ótimos, efeitos de inibidores e íons

metálicos. O extrato bruto apresentou atividade proteolítica de 412 U/mL, tendo uma inibição de pelo Fenilmetilsulfonilflúor (85%) e o íon Fe^{+3} aumentou a atividade em 69%. A atividade ótima foi encontrada em pH 8 a 45°C, com estabilidade termica do extrato entre 25°C e 45°C, mantendo 85% de sua atividade inicial. A protease purificada apresentou um tamanho de 48 KDa, a técnica utilizada apresentou um alto rendimento de 5,9 vezes, a recuperação de 53% e a atividade proteolítica de 256 U/mL. A enzima teve uma inibição pelo Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (60%) e o íon Cu^{+2} (56,5%). A atividade ótima foi encontrada em pH 8,0 a 45°C, com estabilidade da enzima entre 35°C e 50°C, mantendo 70% de sua atividade inicial. A linhagem de *A. sydowii* isolada foi eficaz para a produção de protease com potencial biotecnológico através da FES utilizando o resíduo de café, além de uma possível solução para o dano ambiental provocado pelo borra do café.

ABSTRACT

Proteases are hydrolytic enzymes able to hydrolyze peptide bonds and thereby presenting several applications for industrial purposes (corresponding to 60% of the commercial enzymes). Wasting of agro-industrial raw material generates environmental problems at the same time that represents an economic hindrance. Solid State Fermentation emerges as an alternative to reuse this raw material by providing high quality substrate at a low price for the production of proteases with biotechnological potential. The present work aimed to select *Aspergillus sydowii* strains to perform Solid State Fermentation and then to purify a protease through chromatography process, as well as the determination of its biochemical characteristics. In this study the microorganism cultivated directly in the coffee substrate was isolated and identified regarding to its production potential, the fermentation time, the humidity and the amount of the substrate. For the purification process a number of techniques were used, acetone precipitation, gravitational column using DEAE-Sephadex resin and Superdex 75 gel filtration using the AKTA avant system. Solid state fermentation is a promising technology largely used in a biotechnology process and is a suitable strategy for producing low cost enzymatic products. At the present study, an enzyme obtained through solid state fermentation (SSF) by *Aspergillus sydowii* was herein purified, characterized and tested for its antimicrobial activity. The fermentations used coffee ground residues as substrate and the crude enzyme was submitted through further purification steps of: cetonic precipitation, chromatography through DEAE-Sephadex column and FPLC system (gel

filtration in na Äkta avant system, Superdex 75 collumn). Both crude and purified enzymes were submitted to characterization of their thermostability, optimal temperature and pH, effects of inhibitors and metal ions. A purified protease (48 KDa) was obtained with high yield (5.9 fold) and recovery (53%) with proteolytic activity of 256 U/mL. The enzyme was highly inhibited by phenylmethanesulfonyl fluoride (60%) and the ion Cu^{+2} (56.5%). The optimal activity was found at pH 8, at 45 °C of temperature, with the enzyme stability between 35° C and 50° C (maintaining 70% of its highest activity). It was possible to determine appropriate conditions to the obtainment of thermostable proteases with biotechnological interest associated with a method that concomitantly shows excellent production levels and recovery waste raw material in a very profitable process.

Lista de Abreviaturas e Siglas

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

T: Tonelada

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ABIC: Associação Brasileira da Indústria de Café

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ABECAFE: Associação Brasileira de Exportadores de Café

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

SEBRAE/PE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas em Pernambuco

FES ou SSF: Fermentação em Estado Sólido

PMSF: Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (Phenylmethylsulfonyl Fluoride)

TCA: ácido tricloroacético

Tris: Tris (hidroximetil) aminometano

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

FPLC:

DEAE SEPHADEX:

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

TEMED:

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

KDA: Kilon Dalton

BOD: Câmara de Germinação (germination chamber)

BDA ou PDA:

HCl: ácido clorídrico

HPLC: High Performance Liquide Chromatography

M: Molaridade

NaCl: Cloreto de Sódio

CaCl: Cloreto de Cálcio

FeCl₃: Cloreto de Ferro III

FeCl₂: Cloreto de Ferro II

ZnCl: Cloreto de Zinco

KCl: Cloreto de Potássio

ZnSO_4 : Sulfato de Zinco

CuSO_4 : Sulfato de Cobre

MgSO_4 : Sulfato de Magnésio

Lista de Figuras

Capítulo 2

Figura 1: Perfil de eluição da cromatografia de troca aniônica DEAE-Sephadex.

Figura 2: Perfil de eluição do sistema Superdex 75 FPLC

Figura 3: Electrophoresis (SDS-PAGE.)

Figura 4: Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade protease. Figura 5: pH ótimo e estabilidade de pH

Figura 6: Temperatura ótima e termoestabilidade

Lista de Tabela

Capítulo 1

Tabela 1 Produtos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos

Capítulo 2

Tabela 1: Purificação da protease de *Aspergillus sydowii*

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELA	14
INTRODUÇÃO	17
OBJETIVO	19
GERAL	19
ESPECIFICO	19
CAPÍTULO 1	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1. PROTEASES	20
1.2. FONTES DE PROTEASES	21
1.3. APLICAÇÃO DE PROTEASE NA INDÚSTRIA	22
1.4. O GÊNERO <i>ASPERGILLUS</i>	24
1.5. PROCESSO FERMENTATIVO	25
1.5.1. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	26
1.6. FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	28
1.7. SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS	29
1.7.1 CAFÉ ARÁBICA	31
1.7.1.1 MERCADO BRASILEIRO E MUNDIAL DE CAFÉ	32
1.7.1.2 MERCADO DO CAFÉ NO NORDESTE E EM PERNAMBUCO	34
1.8. TÉCNICAS DE ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	35
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	41
CAPITULO 2	52
PRODUÇÃO DE PROTEASE UTILIZANDO FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR <i>ASPERGILLUS SYDOWII</i> UTILIZANDO O CAFÉ COMO SUBSTRATO	52
RESUMO	53
ABSTRACT	54
INTRODUÇÃO	55
2. MATERIAIS E METODO	56

2.1 PRODUTOS QUÍMICOS	56
2.2 MICRO-ORGANISMO	57
2.3 PREPARAÇÃO DO INOCULO	57
2.4 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (SSF)	57
2.5 EXTRAÇÃO DE ENZIMA	58
2.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASE	58
2.7 MEDIÇÕES DE PROTEÍNAS	58
2.8 PRECIPITAÇÃO CETÔNICA	58
2.9 DEAE-SEPHADEX CROMATOGRAFIA	59
2.10 CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO EM GEL	59
2.11 ELETROFORESE E COLORAÇÃO DE PROTEÍNAS	59
2.12 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA	60
2.12.1 EFEITO DE INIBIDORES E ÍONS METÁLICOS NA ATIVIDADE DA PROTEINASE	60
2.12.2 EFEITO DO PH E TEMPERATURA NA ATIVIDADE DA PROTEASE	60
2.12.3 DETERMINAÇÃO DA TERMOESTABILIDADE	60
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
<hr/>	
3.1 PRODUÇÃO ENZIMÁTICA	60
3.2 PURIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	61
3.3 EFEITOS DE INIBIDORES E METAIS NA ATIVIDADE DA PROTEASE	62
3.4 EFEITOS DA TEMPERATURA E DO PH NA ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA PROTEASE	63
CONCLUSÃO	71
<hr/>	
AGRADECIMENTOS	71
<hr/>	
REFERENCES BIBLIOGRÁFICAS	72
<hr/>	

INTRODUÇÃO

As proteases formam um grupo de enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas em proteínas e peptídios (RAWLINGS et al., 2014; RAO et al., 1998). Sua representatividade na indústria é enorme, sendo considerado o maior grupo enzimático utilizado pela indústria e com forte crescimento, devido a sua versatilidade em processos biotecnológicos (SANDHYA et al. 2005).

A obtenção de enzimas através de processos fermentativos utilizando resíduos agroindustriais vem aumentando devido à consciência ambiental. Nesse contexto, a utilização desses resíduos como base de produção de enzimas através de micro-organismos vem se desenvolvendo no mundo todo, pois as proteases microbianas possuem um enorme valor dentro do mercado mundial de enzimas, sendo esse grupo responsável por 60% do comércio de enzimas do mundo gerando uma receita anual de aproximadamente US \$ 3 bilhões (LI et al., 2016; NOVELLI et al., 2016; SOUZA et al. 2017; CHEN et al., 2016).

Apesar do grande potencial de produção de enzimas, devido a sua diversidade biológica com alto potencial biotecnológico, o Brasil importa a maior parte das enzimas utilizadas pelas indústrias. Necessitando de mais pesquisas não apenas para descobrir espécies viáveis para produção de enzimas mais como melhoramento da produção (ORLANDELLI et al., 2012).

Dentre os micro-organismos, as bactérias e os fungos filamentosos são conhecidos como excelentes produtores de enzimas proteolíticas de interesse industrial (KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012; RADHA et al., 2011). Na literatura referente aos fungos filamentosos, o gênero *Aspergillus* apresenta

bons produtores de enzimas em uma ampla faixa de pH e em diversos tipos de substratos sólidos (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

OBJETIVO

Geral

- Produzir, purificar e aplicar os metabólicos produzidos pelo *Aspergillus sydowii* com potencial biotecnológico

Específico

- Avaliar a produção da protease através da fermentação em estado sólido utilizando o resíduo de café;
- Purificar a protease através de métodos de cromatografia convencionais
- Avaliar o grau de pureza através da eletroforese.
- Caracterizar a enzima quanto ao pH ótimo, termoestabilidade temperatura ótima, efeito de íons e inibidores na atividade enzimática.
- Avaliar o potencial biotecnológico para a indústria.
- Utilização da fermentação em estado sólido para mitigar os danos causados pelos resíduos de café

CAPÍTULO 1

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. PROTEASES

Proteases constituem um grande grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas em outras proteínas e podem ser classificadas como serina, aspártico, cisteína, glutâmico e treonina proteases dependendo dos aminoácidos presentes no sítio ativo, ou como metaloproteases caso seja necessário que a enzima ligue-se a um íon metálico para que ocorra a sua atividade catalítica. Elas são extremamente importante para o comércio pois são utilizadas em diversas indústrias para melhorar a cadeia produtiva (SOUZA et al.,2017 e SETHI et al.,2016) podemos classificar esse grupo ainda em relação ao pH ótimo entre proteases ácidas (pH ácido), proteases neutras (pH neutro) e proteases alcalinas (pH básico). As múltiplas enzimas proteolítica exibem especificidade em substratos, sítio ativo, mecanismo catalítico, pH, temperatura ótima e perfis de estabilidade(SETHI et al.,2016).

. Possui grande representação na indústria sendo considerado o maior grupo enzimático utilizado pela indústria e com forte crescimento devido a sua versatilidade em processos biotecnológicos (SANDHYA et al. 2005).

A especificidade das enzimas proteolíticas é uma das características que as tornam potencialmente ativas na área da biotecnologia, podendo ser classificadas a partir do seu sítio ativo como: serino-proteases, aspartato-proteases, metalo-proteases e cisteíno-proteases, sendo as serino-proteases alcalinas aquelas que possuem a maior importância na indústria (RAWLINGS,2014; SOUZA, 2015; GUPTA, BEG, LORENZ, 2002). Elas ainda

podem ser classificadas utilizando o pH como referência em ácidas, neutras e alcalinas (IQBAL; AHMED; KHAN, 2011; RADHA et al., 2011; RAWLINGS, 2013).

1.2. FONTES DE PROTEASES

De acordo com Rao e et, al. (1998) as proteases podem ser obtidas de diversas fontes. Dentre elas podemos destacar os micro-organismos, sendo eles o que apresenta o maior potencial de produção para indústria devido a sua grande diversidade bioquímica e a facilidade na manipulação genética.

As proteases de plantas são usadas na biotecnologia por terem uma atividade em uma ampla faixa de temperatura e pH (CHEN et al 2016). As enzimas proteasicas são facilmente encontradas em outros grupos como vírus, bactérias, fungos entre outros, tendo uma papel fundamental no processo de digestão desses organismos, sendo assim, vital ao seu metabolismo (FORTES, 2013).

As proteases microbianas são as mais importantes enzimas extra-celulares comerciais e desempenham um papel fundamental nos processos biotecnológicos (LI et al., 2014).

Essas enzimas são fundamentais para constituição e manutenção da vida no nosso planeta, sejam em organismos procariontes ou eucariontes (RAJMALWAR; DABHOLKAR, 2009; KRANTHI; RAO; JAGANMOHAN, 2012). Participam de reações que envolvem desde processos de digestão, ativação de enzimas, cascata de coagulação do sangue, bem como no transporte de proteínas através de membranas (KOBBLITZ, 2008).

As proteases obtidas de plantas e animais possuem dificuldades em relação a sua obtenção. Proteases obtidas de plantas geralmente apresentam um processo demorado de obtenção e podem sofrer com a variação na

quantidade de enzimas dependendo das condições climáticas do local. As proteases de origem animal possuem um maior rendimento de extração em relação às enzimas vegetais, a depender também da biodisponibilidade, como por exemplo na obtenção de proteínas heterólogas, o número de animais necessários para conseguir essas enzimas. No entanto, quando se estuda as proteases de origem microbiana, além da facilidade devido a ampla variedade bioquímica, possui também fatores como rápido crescimento do micro-organismo, o que acelera a obtenção da enzima, a necessidade de pouco espaço para a produção e crescimento, segurança no processo e controle dos parâmetros de produção (RAO et al., 1998). Silva et al, 2009 indicaram que as proteases de origem fungica possuem um importante percentual dessas enzimas chegando a 60% das proteases produzidas e utilizadas pela indústria.

1.3. APLICAÇÃO DE PROTEASE NA INDÚSTRIA

A utilização das enzimas é conhecida ao longo dos tempos de forma empírica na produção de pão, vinho, cerveja, vinagre, queijos, couro, linho e outros. O mercado de enzimas foi formado do desenvolvimento e da biotecnologia moderna, hoje em dia, a produção de enzimas só é possível devido à seleção de linhagens que possibilita sua produção em larga escala, assim como sua caracterização e purificação (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

As proteases possuem uma ampla utilização dentro dos diversos setores industriais, desde processamento de alimentos a farmacêutica. As aplicações alimentares de proteases incluem o seu uso na fabricação de queijo, clarificação de cerveja, bebidas, produção de proteínas e hidrolisados. A protease ácida encontra aplicação na produção de materiais de tempero, hidrolisados de

proteínas, fermentação de molho de soja e como auxiliares digestivos (CHANDEL et al., 2007).

A utilização do grupo das proteases pela indústria possui uma importância enorme em comparação aos outros, somente ela representa 60% das enzimas utilizadas em processos biotecnológicos (JINKA et al., 2009; RAMAKRISHNA et al., 2010). Elas são as biomoléculas de maior interesse dentro do comércio de enzimas no mundo (DUDHAGARA et al., 2014), e dessa forma despertam o interesse pela indústria, visando pesquisas sobre novas enzimas para os setores industriais (DUDHAGARA et al., 2014; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Indústrias do segmento têxtil, alimentos, couro, recuperação de íons metálicos e na área farmacêutica, utilizam proteases para obter uma maior e melhor recuperação de produtos e subprodutos tendo menores gastos (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Na indústria farmacêutica as enzimas proteolíticas são amplamente utilizadas. As proteases podem ser utilizadas de diversas formas tanto na produção de medicamentos, desenvolvimento de outros produtos farmacológicos, no diagnóstico e terapias de várias doenças como cicatrização e terapias antigênicas (MONTEIRO; SILVA, 2009). Enzimas com atividade queratinolítica possuem a capacidade de degradar a queratina, são bastante utilizadas para remoção de calosidade humana, degradação de pele queratinizada, na retirada de queratina no tratamento de acnes, psoríase, além da preparação de vacinas e no tratamento de dermatofitoses (BRANDELLI, DAROIT e RIFFEL, 2010). Diversos autores mostram que extratos enzimáticos produzido por diversos fungos apresentam alguma atividade antimicrobiana significativa contra diversas espécies de bactérias e fungos patogênicos entre elas: *Klebsiella pneumonia*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

subtilis, *S. typhimurium*, *E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Esterococcus* sp., *Salmonella typhy*, *Candida* entre outras. (MARIA, SRIDHAR, RAVIRAJA 2005 ; KATOCH, SALGOTRA , SINGH 2014). Podendo assim dar origem a novos antibióticos e fungicidas.

1.4. O GÊNERO *Aspergillus*

Os fungos do gênero *Aspergillus* pertencem à Família das Trichocomaceae, Ordem Eurotiales, à Classe Eurotiomycetes e ao Filo Ascomycota. Existem mais de 260 espécies dentro deste gênero, mas apenas cerca de 20 têm sido encontradas como causas de doenças em organismos (HUBKA et al., 2013).

As colônias desses fungos, normalmente possuem um desenvolvimento rápido e fortemente distribuído nos substratos, inicialmente apresentam-se com tonalidades esbranquiçadas, amareladas, passando para o marrom, também podendo ser um esverdeado ou negro. Elas são compostas por micélios aéreos com conidióforos eretos sobre a superfície do meio (BENNETT, 2010; HUBKA et al., 2013). A taxonomia conta com 150 espécies, entretanto somente 30 destas são bem definidas (ROSA et al., 2002 e SOUZA et al, 2015). As espécies que compõem o gênero *Aspergillus* podem ser separadas em diversas seções: *Flavi*, *Circundati*, *Nigri*, *Restricti*, *Fumigati*, *Cervini*, *Clavati*, *Cremei*, *Nidulantes*, *Flavipedes*, *Versicolores*, *Usti*, *Terrei*, *Candida*, *Sparsi* e *Wentii*. Cada uma dessas seções possuem características próprias importantes, as espécies que apresentam um bom potencial econômico para indústria pertencem às seções *Flavi*, *Circundati* e *Nigri* (KLICH, 2002; VARGA et al., 2004).

Dentre os gêneros que compõem os fungos filamentosos, os pertencentes ao gênero *Aspergillus* é o que possui características mais adequadas para serem estudadas devido a sua distribuição cosmopolita. Eles representam um dos

grupos responsáveis pela decomposição de material orgânico, ou seja, detritívoro e possuindo diversas enzimas intracelular e extracelular (GIBBONS; ROKAS, 2013), além de produzir diversas biomoléculas que podem ser separadas em quatro grupos: alcaloides, peptídeos não-ribossomais, policetídeos e terpenos (ROHLFS et al., 2007), contudo dentro dessa gama de biomoléculas temos as denominadas de micotoxinas entre elas têm as aflotoxinas (B1, B2, G1 e G2) e Ocratoxina A e Ácido Ciclopiazônico que são tóxicas (GONÇALEZ et al., 2013; ROSA et al., 2002 e SOUZA et al., 2015).

1.5. PROCESSO FERMENTATIVO

Estudos relatam a utilização de fungos filamentosos pela indústria, principalmente do gênero *Aspergillus*, que são utilizados para produzir enzimas extracelulares mais ativas e mais adequados às características físico-químicas (NEIRA-VIELMA et al., 2018).

Para a produção de determinados compostos bioativos, deve levar em consideração a escolha do micro-organismo e tipo de fermentação para o desenvolvimento do processo. As fermentações podem ser em estado sólido (FES) e submersa (FSm). Esta classificação é atribuída em função da quantidade de água utilizada no processo fermentativo (DANTAS; AQUINO, 2010). Subramaniyam e Vimala, (2012) relatam em seus trabalhos que a diferença entre os dois processos acontece uma vez que a fermentação em estado sólido apresenta o substrato umidificado de forma gradativa, além de ser rico em nutrientes e pode ser utilizado por grandes períodos de fermentação. Porém, na fermentação submersa, o substrato está dissolvido em água, os produtos gerados são lançados para o meio líquido e o substrato é rapidamente degradado.

1.5.1. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) pode ser definida como um processo que envolve um substrato sólido com uma ausência, ou quase ausência, de água disponível para que ocorra o crescimento microbiano, simulando condições próximas do natural onde esses micro-organismos se desenvolvem em matéria orgânica úmida, além disso, acredita-se que essa técnica de fermentação ou pelo menos os seus fundamentos tenham dado início ao uso da fermentação desde tempos antigos (PANDEY, 2003). De acordo com Couto e Sanroman (2005), na FES, o fungo atua diretamente sobre o substrato que é insolúvel em água forçando o fungo a esporulação para que as hifas possam se espalhar por todo o substrato. Normalmente, na atividade metabólica do micro-organismo essas enzimas hidrolíticas se difundem na matéria orgânica catalisando o processo de degradação das macromoléculas em estruturas que possam ser absorvidas pelo fungo (HÖLKER; LENZ, 2005).

Nas últimas décadas ocorreu um desenvolvimento significativo referente ao processo de fermentação em escala industrial. Durante a Segunda Guerra Mundial a FS tornou-se o modelo industrial mais utilizado no mundo, contudo a partir da década de 60 a FES vem ganhando espaço (PANDEY, 2003; RODRÍGUEZ COUTO; SANROMÁN, 2005). Novas tecnologias principalmente de recuperação de resíduo favoreceram e muito o avanço nessa área, sobretudo nos processos de recuperação (DA SILVA; SASSON, 1995).

Segundo Santos, (2006) existe uma necessidade da sociedade nos dias atuais de conseguir uma utilização para o resíduo gerado pela indústria para que venha a ter uma redução do impacto provocado. Podemos observar desde a

década de 90 um aumento significativo nos estudos com resíduos da agroindústria típicos de cada país (GONZALEZ-SISO; SISO,1996).

Martins et al., (2011) relatam que através de FES eles foram capazes de produzir e extrair produtos fenólicos. Sethi et al., (2016) produziram proteases com potencial biotecnológico utilizando *A. terreus* através do processo de FES e mostrando que essa tecnologia tem um potencial para produzir biomoléculas que são ecologicamente sustentável e de baixo custo, sendo possível a sua utilização como forma de gestão desses resíduos.

Ao longo das últimas décadas, o processo fermentativo teve grandes modificações e melhorias para maximização da produção com o intuito de aproveitar suas vantagens em relação aos danos ambientais e aos ganhos econômicos gerados não apenas pela geração de um novo produto como pelo baixo custo de produção das biomoléculas (SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

Nesse contexto, a FES tem um papel importante no aproveitamento de resíduos sólidos, não apenas como forma de diminuir problemas ambientais, mas como forma de gerar novos produtos e até mesmo substituir produtos antigos que tenham como sua produção uma forma danosa ao ambiente, sendo possível produzir desde alimentos até biopesticidas. O fator primordial dessa fermentação é a utilização de fungos filamentosos que necessita de pouca atividade de água para seu crescimento (COUTO e SANROMAN, 2006; RODRIGUEZ et al., 2006; PINHEIRO, 2006; GRAMINHA et al., 2008; SUN e XU, 2008).

Zanphorlin et al., 2010 utilizaram o fungo *Myceliophthora* sp. para produção de protease e verificaram que a FES obteve um resultado melhor do que a FSm, verificaram uma produção em torno de quatro vezes maior utilizando como

substrato o farelo de trigo. Entretanto, não podemos dizer que a fermentação em estado sólido é um bioprocesso que substitui a fermentação submersa, uma vez que cada um desses processos possuem suas particularidades (PANDEY et al.,2002).

1.6. FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO EM ESTADO

SÓLIDO

Durante o processo de FES ocorre um aumento rápido da temperatura devido o metabolismo do fungo, sendo assim um problema para esse tipo de fermentação, entretanto, o controle do calor produzido pelo metabolismo do micro-organismo é feito com o balanço hídrico do sistema no início da fermentação (HÖLKER; LENZ, 2005).

Muitos são os fatores que podem influenciar no processo de FES, tais como a seleção do micro-organismo mais adequado, substrato, a umidade, temperatura, atividade de água, pH, concentração de nutrientes e oxigênio essas condições afetam o crescimento e a produção de biomolécula alvo (SINGHANIA et al., 2009).

Para que ocorra a FES de forma adequada é necessário seguir uma serie de etapas são elas: a) seleção da matéria prima, b) tratamento e c) seleção dos micro-organismos utilizados. Além dos parâmetros anteriormente citados faz necessário ainda uma alta atividade de água e o que dificulta, mas não impede que culturas bacterianas tenham sucesso em FES, sendo assim, necessário o monitoramento e controle dos processos da fermentação(PANDEY et al., 2003).

1.7. SUBSTRATOS AGROINDUSTRIAIS

O Brasil por ser um país com dimensões continentais uma grande produção agrícola possui uma variedade de produtos agrícolas. Devido a isso a geração de resíduos causa sérios problemas ambientais e para saúde humana (FERNANDES, 2017). A eliminação de resíduos agroindustriais no ambiente natural pode através do processo de fermentação natural produzir substâncias potencialmente poluidoras como o chumbo que através das chuvas poderiam contaminar rios e outras fontes de água (GRAMINHA et al., 2008).

Com essa variedade da agricultura brasileira muitos são os produtos que podem ser utilizados como substratos para produção de diversos produtos de acordo com Pinto et al (2005) diversas cascas de frutas tropicais além de diversos outros produtos podem ser utilizadas como substrato para produção de enzimas e outras substâncias (Tabela1). De acordo com Canudo (2006) ocorre a utilização produtos provenientes da cana de açúcar, bagaço da mandioca, soro de queijo, água de maceração do milho, farelo de soja e melão de soja.

Tabela 1 Produtos que podem ser obtidos por fermentação em estado sólido a partir de diferentes resíduos e fungos filamentosos

Produto / Processo	Microrganismos principais	Substratos
Enzimas		
Pectinases	<i>Lentinus edodes</i>	Resíduos de frutas
	<i>Aspergillus carbonarius</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Polpa de café
Hemicelulases	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus tamarii</i>	Farelo de trigo / Sabugo de milho / Bagaço de cana
Celulases	<i>Trichoderma reesei</i>	Palha de trigo
Amilases	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de chá
Protease	<i>Rhizopus oryzae</i>	Farelo de trigo
Lipases	<i>Penicillium restrictum</i>	Torta de babaçu
Fitase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo / Farinha de soja
Tanase	<i>Aspergillus niger</i>	Farelo de trigo
Substâncias orgânicas		
Ácido cítrico	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduo de maçã
	<i>Aspergillus niger</i>	Bagaço de cana
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de goiaba
	<i>Aspergillus niger</i>	Resíduos de abacaxi
Ácido giberélico	<i>Gibberella fujikuroi</i>	Farelo de trigo
Pigmentos	<i>Monascus purpureus</i>	Arroz
Carotenóides	<i>Penicillium sp.</i>	Sabugo de milho
Enriquecimento protéico	<i>Penicillium decumbens</i>	Palha de milho
	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Farinha de colza
Biorremediação	<i>Pleurotus ostreatus</i>	Materiais lignocelulósicos
Biopolpação	<i>Pleurotus sp.</i>	Farelo de trigo

Fonte: Pinto et al (2005)

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) 2015, coloca o café como o 5º produto de maior exportação. No ano de 2015, o Brasil produziu mais de 45000 sacas, o que corresponde a cerca de 30% da produção mundial e com um consumo nacional de 4,89 Kg/Habitante ao ano (ABIC, 2015). De acordo com Rocha, (2015) a produção de resíduos de café produzido nas residências e jogado ao lixo chega a 978000 t ao ano no Brasil causando grandes problemas ambientais, podendo ser aproveitado como fonte de substrato para produção de enzimas. É indiscutível as diversas propriedades existentes no café como, antioxidante (Gómez-Ruiz et al., 2007), efeitos sobre diabetes mellitus tipo 2 (Akash et al., 2014) e propriedades anti-inflamatórias e

anti-obesidade (Jia et al., 2014), entre vários outros, entretando pouco é comentado ou mesmo estudado sobre os impactos ao meio ambiente ao longo da sua cadeia produtiva e principalmente após o uso doméstico. Durante a preparação do café como bebida uma grande quantidade de resíduo é gerada cerca de 978000 t no Brasil por ano (Rocha,2015) esse resíduo são gerados principalmente a partir de restaurantes, refeitórios e produção doméstica (Tokimoto et al., 2005). Existe algumas especulações para a utilização desse material extremamente rico no entanto ainda sem aplicação efetiva desse métodos sendo assim o descarte desse produto feito no lixo ou na pia podendo atingir os corpos d'água (Fernandes, 2017).

Mas para um resíduo agroindustrial possa ser utilizado como substrato de uma fermentação assim como o meio de cultura ele deve ter características especiais como: 1) o mais barato possível, 2) não gerar problemas na recuperação da biomolécula alvo, 3) o produto deve possuir a capacidade de armazenamento, 4) ter uma composição razoavelmente fixa e 5) o tratamento dos efluentes deve se de fácil tratamento (SCHMIDELL, 2001).

1.7.1 CAFÉ ARÁBICA

O café é um produto extremamente importante para a economia nacional, com uma produção anual de aproximadamente 50,2 milhões de sacas na safra de 2014, o que corresponde a 35% da produção mundial de café, e incorporação em valor bruto da produção de cerca de R\$ 9,3 bilhões (2014) na economia (MAPA, 2014). Entretanto, durante o processamento físico de café, nas usinas de beneficiamento, bem como após o consumo pela população, é gerado um resíduo imensurável que afeta diretamente o meio ambiente. No mundo, 1/3 do

café consumido é produzido no Brasil, e este ocupa o segundo lugar em número de consumidores atrás, apenas, dos Estados Unidos.

O cafeeiro da espécie *Coffea arabica*, extremamente importante na Agroindústria brasileira, é uma planta Angiosperma, eudicotiledônea, de porte arbustivo, caule lenhoso, folhas persistentes e flores hermafroditas, pertence à família Rubiaceae, e tem cerca de 500 gêneros e mais de 6.000 espécies (CHIANG et al., 2011). No Brasil, é a espécie mais cultivada por possuir diversas peculiaridades. O seu produto é de qualidade superior à espécie *Coffea canephora*, conhecida como Café Robusta ou Conilon, por apresentar, por exemplo, melhor aroma devido à presença de precursores em maior concentração: cafeína, sacarose, trigonelina, derivados fenólicos (LOUARN et al., 2001), e mais resistente ao ataque de pragas quando comparado as espécies *Coffea liberica* e *Coffea dewevrei*, por apresentar característica autopolinizante (MURTHY e NAIDU, 2011).

1.7.1.1 MERCADO BRASILEIRO E MUNDIAL DE CAFÉ

O café constitui uma das principais fontes de divisa cambiais do Brasil. A cada ano são injetados aproximadamente R\$4,5 bilhões de reais no campo (Associação Brasileira de Exportadores de Café - ABECAFÉ). O País é um dos líderes mundiais na produção e exportação de vários produtos agropecuários. É o primeiro produtor e exportador de café, açúcar, etanol e suco de laranja, e esses produtos são os principais geradores de divisas no câmbio mundial. No início de 2010, um em quatro produtos do agronegócio em circulação no mundo eram brasileiros. A projeção do Ministério da Agricultura é que, até 2030, um terço dos produtos comercializados no mundo seja do Brasil, em função

da crescente demanda dos países asiáticos (EMBRAPA). Do total da colheita nacional de café, menos da metade é absorvida pelo mercado interno, a maioria é exportada, principalmente para o Japão, Estados Unidos e Europa. Economicamente, o *C. arabica* responde por mais de 60% da produção mundial de café e é cultivado em mais de 70 países (ANDRADE, SILVEIRA e MAZZAFERA, 2010).

Sabe-se que muitos dos componentes químicos do café são degradados na torra e moimento e a composição de 100 gramas (composição centesimal) apresenta em média: 5,2 a 9,63 % de umidade; 13,76 a 17,69 % de proteínas; 6,93 a 11,12 % de lipídeos; 62,67 a 71,96 % de carboidratos; 4,56 a 4,96 % de cinzas; e 14,60 a 21,48 % de fibras brutas (SILVA et al., 2007). Devido a sua composição com alto teor de açúcares e mucilagens, o fruto úmido de café constitui um meio de cultura propício ao desenvolvimento de micro-organismos. A casca e a polpa de café, resíduos de despulpamento, possuem uma quantidade significativa de açúcares fermentescíveis, constituindo substrato apropriado para o cultivo de fungos e leveduras (ALMEIDA et al., 2006).

O processamento do café gera grandes quantidades de resíduo sólido (casca ou polpa, dependendo do processo). A quantidade de resíduos produzidos cresce concomitantemente à produção de café, sobretudo em virtude do processamento pós-colheita, fundamental para a obtenção de uma bebida de boa qualidade e destino final do pó utilizado no preparo doméstico e comercial. Atualmente, não existe nenhuma aplicação para o resíduo do pó dos grãos de café, o que o torna um grande problema ambiental. Mesmo sendo um excelente adubo orgânico, grande parcela do pó de café vem sendo desprezado por agricultores que não têm conhecimento do seu grande fornecimento de matéria

orgânica, bem como pelos consumidores domésticos, onde técnicas culinárias poderiam inserir os resíduos na aromatização, bem como na produção de outros alimentos (BADOCHA, COSTA, LEÔNIDAS, 2003). Na indústria alimentícia, a borra pode ser utilizada na fabricação de biscoitos devido a sua elevada quantidade de fibras alimentares. Com o aumento da produção industrial, a geração de resíduos têm se tornado um problema para a sociedade contemporânea, principalmente para os setores agroindustriais e de alimentos. Os subprodutos agrícolas contêm uma variedade de espécies biologicamente ativas, incluindo enzimas, peptídeos ativos, moléculas ricas em polifenóis antioxidantes, que na maioria das vezes é descartada (RICE-EVANS, 2001). Contudo é de fundamental importância utilizar tecnologias que aproveitem este crescente volume de resíduos gerados, uma tecnologia fermentativa de grande potencial é a FES (ALEXANDRINO et al., 2007).

1.7.1.2 MERCADO DO CAFÉ NO NORDESTE E EM PERNAMBUCO

O Nordeste é a segunda região em volume produzido no país. Os números, porém, é bem abaixo do Sudeste, detentor de 83% do total nacional. A produção nordestina vem quase que totalmente da Bahia, com 97% do total. Ceará, Pernambuco e Alagoas respondem pelo restante (3%). Segundo dados do SEBRAE/PE (2011), Pernambuco ocupa a décima terceira posição entre os Estados produtores de café no Brasil.

Uma análise mais detalhada indica uma diminuição da atividade no Estado, apesar do aumento da área plantada, havendo em alguns municípios abandono da atividade. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em junho de 2010, eram 3.873 hectares destinados à plantação de café, com previsão de 3.892 para 2011. A reduzida área significa diretamente baixa

capacidade de produção. Calcula-se que o volume produzido pelo Estado pernambucano atende a apenas 10% do próprio consumo. Segundo o IBGE, em 2009 o Estado alcançou cerca de 1.8 toneladas de café em grãos, ou 1% do produzido pelo Nordeste. A cafeicultura em Pernambuco concentra-se nos municípios do Agreste, devido às características climáticas e de altitude. Essa mesorregião é responsável por 92% do total estadual. Com mais de 1/3 do café produzido no Estado, Taquaritinga do Norte aparece na liderança do ranking de municípios produtores, Garanhuns (300 t) e Brejão (290 t) ocupam a segunda e terceira posições, respectivamente. Mesmo com a supremacia das cidades do Agreste, há registros, segundo o IBGE (2009), de produção em Triunfo, Exu, Santa Cruz da Baixa Verde e Moreilândia, localizadas no Sertão.

1.8. TÉCNICAS DE ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

O isolamento de biomoléculas a partir de micro-organismos, em grande parte, inicia-se com a obtenção de líquidos metabólicos utilizando diversas soluções, onde serão extraídos os compostos de maior afinidade com o solvente. As proteases de fungos têm sido purificadas por métodos convencionais que se baseiam nos seus aspectos moleculares gerais, tais como: carga elétrica, tamanho, solubilidade e hidrofobicidade. Os principais métodos empregados em diversas áreas como na biotecnologia ou no estudo dos poluentes ambientais são: precipitação salina (SILVA et al., 2009), cromatografia de afinidade e gel filtração (TAKAHASHI, 2008), cromatografia de troca iônica (WATANABE et al., 2008), cromatografia de fase reversa (RODRIGUES-NOGALES et al., 2010), cromatografia de partição líquido-líquido (COSTA e LEITÃO, 2011), entre outros.

Para o estudo inicial do isolamento e purificação de proteínas, por exemplo, preferencialmente inicia-se com procedimentos de fracionamento salino a partir da adição de um sal, geralmente, sulfato de amônio (HEU et al., 1995).

Devido ao grande aumento da utilização de enzimas e proteínas oriundas de processos fermentativos diversas técnicas são utilizadas com o objetivo de isolar a molécula alvo. A esquematização básica desse processo foi proposta pelo químico Arthur B. Little, em 1917 dividindo o processo em quatro etapas: 1) clarificação ou remoção de compostos insolúveis, 2) isolamento do produto ou concentração, 3) purificação intermediária e 4) polimento (ZUÑIGA 2003).

Como isso, temos diversas técnicas para cada etapa do processo de purificação, promovendo assim uma melhor purificação da biomolécula alvo (Tabela 2).

TABELA 2: Técnica de separação que podem ser usadas nas diferentes etapas do processo de purificação

Etapa de purificação					
Técnica de Isolamento / separação	Clarificação ou Remoção de compostos insolúveis	Concentração ou isolamento do produto	Purificação intermediária	Purificação Final	Autores
Precipitação	*				CHISTI, 1998; GLATZ 1998; TEOTIA, 2001
Centrifugação	*				LALI; ARUNA; JOHN & THAKRAR, 2000; NIVEN, 2003; SARDAR & GRUPTA 1998; WESTFALIA, 2001
Sistemas aquosos Bifásicos	*	*	*		ALBERTSSON, 1990; COIMBRA, TÖMMES, MEIRELLES & KULA, 1995; GIRALDO-ZUÑIGA, COIMBRA & MINIM, 2001
Cromatografia de troca iônica		*	*	*	ETZEL, 1995; GERBERDING & BYERS, 1998; HEDDLESON, ALLEN, WANG & SWAISGOOD, 1997; MORR & HA, 1993; PASECHNIK & PHLS, 1995; PEREIRA, 1999
Cromatografia De Afinidade		*	*	*	CLONIS, 1990; NIVEN, 2003;
Cromatografia de Exclusão molecular			*	*	RICKER & SANDOVAL 1996; IRVINE, 1997; COLLINS, 1997
Ultrafiltração				*	FANE & RADOVICH, 2003; SAKSENA & ZYDNEY, 1994; SINGH & HELDMAN, 1993
Osmose reversa				*	FANE & RADOVICH, 2003; ROSENBERG, 1995
Microfiltração		*			FANE & RADOVICH, 2003; ROSENBERG, 1995; FANE & RADOVICH, 1990

O Processo de precipitação é utilizado como forma de separar e recuperar proteínas solúveis, mediante a utilização de substâncias que possam interagir com as ligações de hidrogênio fazendo com que as proteínas possam precipitar, é uma técnica simples e rápida que além de separar, concentra as proteínas diminuindo o volume da amostra, sendo assim muito utilizada na indústria como etapa inicial do processo de purificação (ZUÑIGA 2003).

Entre os métodos mais modernos de purificação de moléculas temos a cromatografia como principal técnica. Ele consiste em um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, possuindo duas fases que estão intimamente ligados, onde uma delas é fixa ou estacionária e a outra é móvel. Elas podem ser divididas em: cromatografia líquida e cromatografia sobre pressão dentre elas podemos destacar a cromatografia de troca iônica (COLLINS, 2007).

Segundo Spadaro, 2007 a cromatografia de troca iônica possui um mecanismo de funcionamento onde a parte estacionária é altamente carregada atraindo assim moléculas com cargas opostas eliminando todas as estruturas com potencial elétrico igual ao da matriz da fase estacionária. O material fixado, ou seja, adsorvido pela matriz eletricamente carregada pode ser posteriormente eluído com outros íons com o mesmo tipo de carga da molécula capturada, porém, com uma maior força de interação desses íons com a matriz. Essa afinidade da matriz com a molécula ou com os íons pode ser modificada com a alteração do pH da solução tornando mais fácil a retirada da molécula desejada.

A cromatografia é uma técnica de separação diferencial dos componentes de uma amostra, entre uma fase móvel e uma fase estacionária (partículas

esféricas empacotadas numa coluna). A mistura de proteínas ou outros produtos biológicos a separar são aplicados na fase estacionária e migram através da coluna. Os processos cromatográficos normalmente conduzem a seletividades elevadas. Os fatores que influenciam a eficiência deste processo são a qualidade do suporte cromatográfico, a dispersão axial e a dificuldade de estabelecimento de equilíbrio entre a fase móvel e estacionária. Diferentes suportes são utilizados em cromatografia, incluem-se polissacarídeos (dextrana, agarose e celulose), polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno), materiais inorgânicos (sílica porosa, hidroxiapatita e vidro poroso) e materiais compósitos (poliacrilamida-agarose, dextrana-bisacrilamida, sílica porosa-dextrana). Dependendo do tipo de interações envolvidas, os processos cromatográficos podem ser classificados em gel filtração, troca iônica, interação hidrofóbica, fase reversa e afinidade (AIRES-BARROS e CABRAL, 2003), bem como em fluxo rápido em sistema AKTA e de alto desempenho através da cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (GUGGISBERG et al., 2012). A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é certamente, na atualidade, a técnica de escolha para a análise do perfil de isolamento de uma grande variedade de moléculas. Em particular, a HPLC nas suas várias modalidades (fase contínua e fase reversa), tornou-se a técnica central na caracterização de biomoléculas como, por exemplo, peptídeos, proteínas, polifenóis e Vitamina B₁₂ (GUGGISBERG et al., 2012; SHI et al., 2012) e tem, portanto, desempenhado um papel crítico nos avanços rápidos nas ciências biológicas e biomédicas ao longo dos últimos 10 anos (LEE et al., 2011). O enorme sucesso da utilização da HPLC pode ser atribuído a uma série de características associadas com reprodutibilidade, facilidade de manipulação, seletividade e alto rendimento. A

característica mais significativa deste processo cromatográfico é a excelente resolução, quando, então, comparada às técnicas cromatográficas de bancada, as quais são bastante limitadas à separação de moléculas, cujo perfil estrutural ou de cargas são similares.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S. & DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. (1998) 597-635
2. VISHWANATHA, K.; APPURAO, A; SINGH, S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Food Chemistry*, 114, 2, (2009) 402–407..
3. SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40, 8, (2005) 2689–2694.
4. Novelli, P.K., Barros, M.M., Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: production by solid state fermentation and characterization. *Food Chem*. 198,(2016)119-124.
5. Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res*. 42, (2014) 503-509.
6. SOUZA, Paula. Monteiro., Produção de proteases por fungos filamentosos isolado do cerrado do centro-oeste brasileiro / Paula Monteiro de Souza. São Paulo,2015. 125p. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica.
7. GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 59,1, (2002) 15-32

8. SOUZA, P. et al. Production, purification and characterization of an aspartic protease from *Aspergillus foetidus*, (2017), 1-8.. DOI: [dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055](https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.055)
9. IQBAL, H. M. N.; AHMED, I.; KHAN, M. A. Partial Characterization of Purified Protease Produced from *Rhizopus oligosporus* Using a by-products of Oil Industry. *World Applied Sciences Journal*, 13, 3, (2011) 600–605.
10. RADHA, S. et al. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. *Scholars Research Library*, 3, 2 (2011) 155–163.
11. RAWLINGS, N. D. *Protease Families, Evolution and Mechanism of Action*. Vienna: Springer Vienna, , 2013. (Nota técnica).
12. LI, C. et al. Production optimization, purification, and characterization of a novel acid protease from a fungus by *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *European Food Research and Technology*, 6 fev. 2014.
13. RAJMALWAR, S.; DABHOLKAR, P. Production of protease by *Aspergillus* sp. using solid-state fermentation. *African Journal of ...*, 8,17 (2009) 4197–4198.
14. KRANTHI, V.S., RAO, D.M., JAGANMOHAN, P., Production of protease by *Aspergillus flavus* through solid state fermentation using different oil seed cakes, *Int. J. Microbiol.* 1 (2012) 12–15.
15. KOBLITZ, M. G. B. *Bioquímica de alimentos: Teoria e Aplicações Práticas*. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2008.
16. SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS, E. S. (2009) Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos

agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR Campus Ponta Grossa - Paraná - Brasil ISSN: 1981-3686 / 03 (01) 28-41.

17. KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13,4(2002) 345–351.

18. CHANDEL, A.K., RUDRAVARAM, R., RAO, L.V., RAVINDRA, P., NARASU,M.L. Industrial enzymes in bioindustrial sector development. An Indian perspective. *J. Commer. Biotechnol.*13,4 (2007) 283–291.

19. JINKA, R., RAMAKRISHNA, V., RAO, S., RAO, R.P. Purification and characterization of cysteine protease from germinating cotyledons of horse gram. *BMC Biochem.*10,(2009) 1–11.

20. RAMAKRISHNA, V., RAJASEKHAR, S., REDDY, L.S. Identification and purification of metalloprotease from dry grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160, (2010) 63–71.

21. DUDHAGARA, P. et al. Isolation, Characterization and investigating the Industrial Applications of Thermostable and Solvent Tolerant Serine Protease from Hot Spring Isolated Thermophilic *Bacillus licheniformis* U1. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2, 1, (2014) 75–82.

22. MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. *Revista Processos Químicos*, (2009) 9–23..

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

24. BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85, 6 (2010) 1735-1750.
25. SHANG, Q. et al.,. Partitioning behavior of amino acids in aqueous two-phase systems containing polyethylene glycol and phosphate buffer. *Fluid Phase Equilibria*, 219, 2, (2004) 195–203.
26. MARIA, G. L.; SRIDHAR, K. R.; RAVARAJA, N. S.; Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, 2005
27. KATOCH, M. ; SALGOTRA, A.; SINGH, G.; Endophytic Fungi Found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes and Antimicrobial Bioactive Compounds. *BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY*, 57, 5, (2014) 714-722
28. BENNETT, J. W. An Overview of the Genus. *Molecular Biology and Genomics*, (2010) 1 – 19.
29. HUBKA, V. et al. Taxonomic revision of *Eurotium* and transfer of species to *Aspergillus*. *Mycologia*, 105, 4, (2013) 912–37.
30. ROSA, C. A. R.; CAMPOS, S. G.; BARONI, F. A.; Prática de micologia veterinária. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Departamento de Micologia e Imunologia Veterinária. *Micologia Veterinária. Prática 8*. Saropédica, 2002.
31. SOUSA, P. M., BITTENCOURT, M. L. A., CAPRARA, C. C., FREITAS, F., ALMEIDA, R. P. C., SILVEIRA, D., ... MAGALHÃES, P. O., A biotechnonology perspective of fungal proteases 46,2, (2015) 337-346
32. KLICH, M. A. Identification of common *Aspergillus* species. *Ilustrada ed.* [s.l: s.n.]. p. 510 (2002)

33. VARGA, J. et al. Molecular Diversity of Agriculturally Important *Aspergillus* Species. *European Journal of Plant Pathology*, 110,5/6, (2004) 627–640
34. GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in microbiology*, 21, 1,(2013)14–22.
35. ROHLFS, M. et al. Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biology letters*, 3, 5 (2007) 523–525..
36. GONÇALEZ, E. et al. Produção de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amendoim. *Arquivos do Instituto Biológico*, 80, 3, (2013) 312–317.
37. SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid State And Submerged Fermentation For The Production Of Bioactive Substances : A Comparative Study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 3, (2012) 480–486.
38. RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22, 3, (2005) 211–219
39. HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation: are there any biotechnological advantages? *Current opinion in microbiology*, 8, 3,(2005) 301-306.
40. PANDEY, A., Solid-state fermentation, *Biochem. Eng. J.* 13 (2003) 81–84.
41. ALBERTSSON, P.A.; JOHANSSON, G.; TJERNELD, F. Aqueous two-phase separations. In: *SEPARATION processes in biotechnology*. New York: Marcel Dekker, (1990) 287-327.

42. CHISTI, Y. Strategies in downstream processing. In: BIOSEPARATION and bioprocessing a handbook. New York: Marcel Dekker, 2, (1998) p. 3-30.
43. CLONIS, Y. D. Process affinity chromatography. In: SEPARATION processes in biotechnology. New York: Marcel Dekker, (1990) 401-445.
44. COIMBRA, J.R.; TÖMMES, J.; MEIRELLES, A.J.; KULA, M.R. Performance of graesser contactor in the continuous extraction of whey proteins: mixing, mass transfer and efficiency. *Bioseparation*, 5, (1995) 259-268.
45. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Unicamp, (1997). 279 p.
46. ETZEL, M.R. Whey protein isolation and fractionation using ion exchangers. In: BIOSEPARATION processes in foods. New York: Marcel Dekker, (1995) 389-415.
47. GERBERDING, S.J.; BYERS, C.H. Preparative ion-exchange chromatography of proteins from dairy whey. *Journal of Chromatography*, 808, (1998) 141-151.
48. GIRALDO-ZUÑIGA, A.D.; COIMBRA, J.S.R.; MINIM, L.A. Coeficientes de partição da α -Lactoalbumina e α -Lactoglobulina em sistemas aquosos bifásicos: influência da massa molar do polímero. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 3,3, (2001) 149-155.
49. GLATZ, C.E. Precipitation. In: BIOSEPARATION and bioprocessing a handbook New York: Marcel Dekker, 2, (1998) 329-356.
50. HEDDLESON, R.A.; ALLEN, J.C.; WANG, Q.W.; SWAISGOOD, H.E. Purity and yield of beta-lactoglobulin isolated by an N-retinyl-Celite bioaffinity column. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 7, (1997) 2369-2373.

51. IRVINE, G.B. Size-exclusion high-performance liquid chromatography of peptides: a review. *Analytica Chimica Acta*, 352, (1997) 387-397.
52. LALI, A.; ARUNA, N.; JOHN, R.; THAKRAR, D. Reversible precipitation of proteins on carboxymethyl cellulose. *Process Biochemistry*, 35,(2000) 777-785.
53. NIVEN, G.W. Separation processes for biotechnology in the food industry. In: B.CEPPA, Curitiba, v. 21, n. 1, jan./jun. 2003
54. PASECHNIK, V.A.; PHLS, J.M. Large-scale extraction and purification of enzymes and other proteins. In: HANDBOOK of enzyme biotechnology. New York: Wiseman, (1995) 31-82.
55. PEREIRA, J.A.M. Adsorção de beta-galactosidase de *Scopulariopsis* sp. em resina trocadora de íons objetivando a purificação e a ampliação de escala, Campinas, SP: FEQ, UNICAMP, 1999. 138 p. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas.
56. RICKER, R.D.; SANDOVAL, A.A. Fast, reproducible size-exclusion chromatography of biological macromolecules. *Journal of Chromatography*, v. 743, p.43-50, 1996.
57. TEOTIA, S.; KHARE, S.K.; GUPTA, M.N. An efficient purification process for sweet potato beta-amylase by affinity precipitation with alginate. *Enzyme and Microbial Technology*, 28,(2001) 792–795.
58. RODRÍGUEZ COUTO, S.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22,3, (2005) 211–219.
59. KATOCH, M. ; SALGOTRA, A.; SINGH, G.; Endophytic Fungi Found in Association with *Bacopa monnieri* As Potential Producers of Industrial Enzymes

and Antimicrobial Bioactive Compounds. BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY, 57,5, (2014) 714-722.

60. GONZALEZ-SISO, M. I.; SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. Bioresource Technology, 57,1,(1996) 1-11.

61. MARTINS, S.; MUSSATTO, S. I.; MARTÍNEZ-AVILA, G.; MONTANEZ-SAENZ, J.; AGUILAR, C. N.; TEXEIRA, J. A. Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. Biotechnology Advances, New York, 29, 3, (2011) 365-373.

62. COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry - A review. Journal of Food Engineering, 76, 3, (2006) 291–302.

63. PINHEIRO, T. L. F. Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microorganismo. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Rio Grande do Sul. 2006. (Dissertação de Mestrado).

64. GRAMINHA, E.B.N.; GONÇALVES, A.Z.L.; PIROTA, R.D.P.B.; BALSALOBRE, M.A.A; GOMES, E.R.S. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. Animal Feed Science and Technology, 144, (2008) 1–22.

65. SUN, S. Y.; Xu, Y. Solid-state fermentation for whole-cell synthetic lipase production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. Process Biochemistry, 43, (2008) 219–224.

66. ZANPHORLIN, L. M. et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic

fungus *Myceliophthora* sp. Journal of microbiology (Seoul, Korea), 48, 3, (2010) 331–6.

67. A. PANDEY, C.R. SOCCOL, J.A. RODRIGUEZ-LEON, P. Nigam, Solid State Fermentation in Biotechnology: Fundamentals and Applications, Bioresour. Technol. 82 (2002) 8524.

68. SCHMIDELL, Willibaldo. In: MICRO-ORGANISMOS E MEIO DE CULTURA PARA UTILIZAÇÃO INDUSTRIAL, Schmidell, Willibaldo, LIMA, Urgel Almeida ; Aquaroma, Urgênio; Borzani, Walter. Biotecnologia Industrial São Paulo EDGARD BLUCHER, (2001) 5-18.

69. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R. et al. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry, 46,10, (2011) 2001– 2006.

70. SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40, 8, (2005) 2689– 2694.

71. CHEN, Y et al. Characterization of functional proteases from flowers of tea (*Camellia sinensis*) plants. Journal of Functional Foods, 25 (2016) 149-159

72. SETHI B.K. et al. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels. Journal of Taibah University for Science, (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2015.11.001>

73. SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochemistry, 40, 8, (2005) 2689– 2694.

74. KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. Current Opinion in Biotechnology, 13,4, (2002) 345–351

75. Chandel, A. K., Rudravaram, R., Rao, L. V., Ravindra, P. and Narasu M. L. Industrial enzymes in bio-industrial sector development, An Indian perspective. *Journal of Commercial Biotechnology*. 13,4 (2007) 283-291.
76. BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85,6,(2010) 1735-50.
77. NEIRA-VIELMA, A. A., AGUILAR, C. N., ILYINA, A., CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C., CARNEIRO-DA-CUNHA, M. das G., MICHELENA-ÁLVAREZ, G., & MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, J. L. Purification and biochemical characterization of an *Aspergillus niger* phytase produced by solid-state fermentation using triticale residues as substrate. *Biotechnology Reports*, 17(2018), 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.12.004>
78. Singhanian, R.R. Patel, A.K. Soccol, C.R. Pandey, A. Recent advances in solid-state fermentation, *Biochemical Engineering Journal* 44 (2009) 13–18
79. Fernandes, A. S. Mello, F. V.C. Thode Filho, S. Carpes, R. M. Honório, J. G. Marques, M. R.C. Felzenszwalb, I. Ferraz, E. R.A. Impacts of discarded coffee waste on human and environmental health, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141 (2017) 30–36
80. GÓMES-RUIZ, J. A. LEAKE, D.S. AMES, J. M. P & A - 084 In Vitro Antioxidant Activity of Coffee Compounds and Their, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 6962-6969
81. AKASH, M. S. H. REHMAN, K. CHEN, S. Effects of coffee on type 2 diabetes mellitus, *Nutrition* 30 (2014) 755-763

82. PINTO, G. A. S. ANDRADE, A. M. R. FRAGA, S. L. P. TEIXEIRA, R. B. Solid state fermentation: An alternative to reuse and valorization of tropical agroindustrial residues, Embrapa Comunicado Técnico 102 (2005) 1-5

83. CANUTO, A. P. Desenvolvimento de bioprocesso para produção de goma xantana por fermentação no estado sólido a partir de resíduos e subprodutos agroindustriais. Universidade Federal do Paraná. 2006. (Dissertação de Mestrado)

Capítulo 2

Produção de protease utilizando fermentação em estado sólido por *Aspergillus sydowii* utilizando o café como substrato

Felype Thomaz de Brito Rocha, Romero Marcos Pedrosa Brandão-Costa,
Wendell Wagner Campos Albuquerque, Polyanna Nunes Herculano, Ana Lúcia
Figueiredo Porto

A ser submetido à Brazilian Journal of Microbiology



Resumo

A fermentação em estado sólido é uma tecnologia promissora amplamente utilizada em processos biotecnológicos e é uma estratégia importante para a produção de produtos enzimáticos de baixo custo. No presente estudo, uma protease obtida por meio de fermentação em estado sólido (SSF) por *Aspergillus sydowii* foi aqui purificada e caracterizada. As fermentações utilizaram resíduos de café como substrato e o extrato bruto foi submetido através de etapas de purificação adicionais: precipitação cetônica, cromatografia através da coluna DEAE-Sephadex e sistema FPLC (filtração de gel no sistema Äkta avant, coluna Superdex 75). O extrato proteolítico bruto e purificados foram submetidos a uma caracterização de sua termoestabilidade, temperatura, pH ótimos, estabilidade de pH, efeitos de inibidores e íons metálicos. Uma protease purificada (48 KDa) foi obtida com alto rendimento (5,9 vezes) e recuperação (53%) com atividade proteolítica máxima de 256 U / mL. A enzima foi altamente inibida por fenilmetilsulfonilfluor (60%) e o íon Cu^{+2} (56,5%). a atividade ideal foi encontrada em pH 8,0 a 45 ° C de temperatura, com a estabilidade da enzima entre 35 ° C e 50 ° C, mantendo 70% de sua maior atividade. Foi possível determinar condições adequadas para a obtenção de proteases termoestáveis com interesse biotecnológico associado a um método que mostra concomitantemente níveis de produção excelentes e recupera resíduos de matéria-prima.

Palavra - chave: Proteases; *Aspergillus sydowii*; Resíduo de café; Fermentação em estado sólido.

Abstract

Solid-state fermentation is a promising technology widely used in biotechnological processes and is an important strategy for the production of inexpensive enzyme products. In the present study, a protease obtained by solid state fermentation (SSF) by *Aspergillus sydowii* was purified and characterized herein. The fermentations utilized coffee residues as substrate and the crude extract was subjected to additional purification steps: ketone precipitation, DEAE-Sephadex column chromatography and FPLC system (gel filtration in the Äkta avant system, Superdex 75 column). The crude and purified proteolytic extract were subjected to a characterization of their thermostability, temperature, optimum pH, pH stability, effects of inhibitors and metal ions. A purified protease (48 KDa) was obtained with a high yield (5.9 times) and recovery (53%) with maximum proteolytic activity of 256 U / mL. The enzyme was highly inhibited by phenylmethylsulfonylfluor (60%) and the Cu + 2 ion (56.5%). the ideal activity was found at pH 8.0 at 45 ° C temperature, with the enzyme stability between 35 ° C and 50 ° C, maintaining 70% of its highest activity. It was possible to determine suitable conditions for obtaining thermostable proteases of biotechnological interest associated with a method which concomitantly shows excellent production levels and recovers raw material residues.

Key - words: Proteases; *Aspergillus sydowii*; Coffee residue; Fermentation in solid state.

INTRODUÇÃO

A recuperação de resíduos agrícolas associada ao desenvolvimento de técnicas de conversão de matéria-prima em produtos economicamente úteis faz com que a pesquisa de bioconversão por microorganismos seja cada vez mais relevante. A produção de proteases usando substratos sólidos através de processos de fermentação é apontada no presente estudo como uma alternativa de baixo custo para a recuperação de resíduos.

As proteases hidrolizam as ligações peptídicas e fornecem modificações essenciais nas proteínas que estão envolvidas no processo de digestão, ativação de enzimas, coagulação sanguínea e transporte de membrana. Eles têm uma variedade de funções e representam aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas, sendo freqüentemente usado em indústrias de detergente, couro, farmacêuticas e alimentares [1,2].

Processos para a obtenção de proteases derivadas de plantas são lentos porque o longo período de desenvolvimento da planta (referência). Ao mesmo tempo, as proteases de origem animal (por exemplo, pepsina, quimosina e tripsina) precisam ser preparadas em grande escala e dependem do gado para abate, o que dificulta seu uso. As proteases microbianas, por outro lado, são consideradas enzimas lucrativas comerciais, porque sua diversidade bioquímica, crescimento rápido e produção rápida e segura [3], apresentando, portanto, maior potencial econômico.

Os fungos filamentosos são amplamente aplicados para a produção de enzimas como amilases, lipases, proteases e pectinases [4], e os processos são vantajosos pelo baixo custo de materiais, alta produção e recuperação, uma vez

que são obtidos a partir do meio extracelular [5,6]. O gênero *Aspergillus* é o fungo filamentoso mais comum usado na indústria.

A fermentação de estado sólido (SSF) proporciona algumas vantagens sobre o submerso (FSm), tais como: o uso de resíduos agrícolas como substratos (farelo de trigo, soja, arroz, bagaço e nozes); requer pouca quantidade de água; produz metabolitos mais concentrados; obtido por processo estacionário (não causando custos de energia); e na maioria dos casos o rendimento da enzima é maior [7].

Com a alta produção da indústria mundial do café, gera-se muito desperdício e estima-se que 9,9 milhões de resíduos sólidos sejam produzidos anualmente em todo o mundo [8], o que chama a atenção para um alto desperdício de matérias-primas e danos ambientais.

A eliminação de resíduos nos processos agroindustriais representa uma grande desvantagem financeira que poderia ser impedida de reutilizar matérias-primas para a obtenção de enzimas biotecnológicas. O presente trabalho tem como objetivo acompanhar o processo multiprocesso (produção, purificação, caracterização e aplicação) para a conversão de resíduos de café em terra em uma protease purificada através de fermentação em estado sólido por *Aspergillus sydowii*.

2. Materiais e metodo

2.1 Produtos Químicos

Azocaseína, DEAE-sephadex G50, ácido tricloroacético, sulfato de amónio, b-mercaptoetanol, Tris (hidroximetil) aminometano, glicina, fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) e marcadores proteicos de pesos moleculares foram adquiridos à Sigma Chemicals (St. Louis, USA). Persulfato de amônio, N, N, N',

N-tetrametiletileno diamina (TEMED), acrilamida, dodecil sulfato de sódio (SDS) e Coomassie Brilliant Blue R-250 foram obtidos da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA). Todos os outros reagentes foram de grau analítico.

2.2 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi o *Aspergillus sydowii*, isolado da borra de café e devidamente identificado pela Coleção de Cultura URM da Universidade Federal de Pernambuco. As culturas foram estocadas em meio Agar de Dextrose de Batata (PDA) em temperatura ambiente e replicado a cada 15 dias.

2.3 Preparação do Inoculo

O inoculo foi preparado suspendendo os esporos no meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) em solução de NaCl 0,15 M (5 mL), por 7 dias a 30 ° C. A quantidade de esporos foi padronizada em uma câmara de Neubauer (Laboroptik, Lacing, Reino Unido) para obter a concentração final de 10^7 esporos / mL. O volume ajustado a 60% da umidade inicial, em pH neutro, foi posteriormente utilizado para inocular os frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 4 gramas de resíduo de café.

2.4 Fermentação em estado sólido (SSF)

A fermentação em estado sólido (SSF) foi utilizada como fonte de carbono e nitrogênio a partir de resíduos do cafeeiro. Os resíduos de café foram obtidos no restaurante universitário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Brasil, e mantidos em estufa por um período de 72 horas a 50°C, para garantir a secagem completa do café. As fermentações foram realizadas com 4 g, 5g, 10g, 40g e 200g de resíduo de café, durante 96 h, 120 h e 144 h, e com umidade 40%, 50% e 60% a 30°C, conforme [7] e depositado em

câmara de germinação (DBO) até o final do processo. Tendo como a melhor produção com 4g, 120h a 60% de umidade.

2.5 Extração de Enzima

Para a extração da protease, 7,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8,0 por grama de substrato foram adicionados ao meio fermentado e com o auxílio de um bastão de vidro o fungo foi solto e homogeneizado utilizando mesa agitatoria por 5 min a 100 rpm. Depois o extrato foi filtrado utilizando papel filtro, após o processo de filtração o extrato obtido foi submetido à centrifugação a 5000 rpm e o sobrenadante coletado e utilizado como extrato bruto para os passos de purificação subsequentes.

2.6 Determinação da atividade de protease

A determinação da atividade das proteases foi realizada de acordo com a metodologia proposta [9], utilizando como substrato de Azocaseína a 1% e a leitura das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro a 420nm.

2.7 Medições de Proteínas

A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método de Smith et al (1985) [10]. A albumina de soro bovino foi usada como proteína padrão para determinação de proteína.

2.8 Precipitação cetônica

O processo de purificação parcial foi realizado utilizando o método de precipitação com acetona a 70% e centrifugado a 16.800 x g durante 10 min. Em seguida o precipitado foi separado do sobrenadante e resuspenso em tampão Tris-HCl pH 8,0.

2.9 DEAE-Sephadex Cromatografia

O extrato pré-purificado foi submetido a uma coluna DEAE-Sephadex G-50, equilibrada com tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Neste caso, as amostras foram eluídas com diferentes concentrações de soluções de NaCl (0,3 M, 0,6 M e 1 M), diluídas no mesmo tampão. As frações contendo proteínas foram reunidas para posterior análise, todo o processo foi monitorado com espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 280nm. Em todas as etapas as frações possuíam 1 ml e foram coletadas a uma taxa de fluxo de 1 ml/ min após o tampão de eluição.

2.10 Cromatografia de Filtração em Gel

A análise de filtração em gel foi realizada utilizando tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8) adicionado de NaCl 0,15 M num sistema ÄKTA Avant 25 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) em Superdex 75 (HR10 / 300GL), PC 3.2 / 30 coluna, conforme descrito nas instruções do fabricante. A absorbância das amostras foi avaliada em 215 nm e 280 nm. A coluna foi calibrada utilizando uma mistura de marcadores de peso molecular (1 mg / mL cada): albumina de soro bovino, anidrase carbônica e albumina de ovo de galinha e um inibidor de tripsina

2.11 Eletroforese e coloração de proteínas

O método SDS-PAGE foi realizado de acordo com Laemmli (1970) [11], com 10% de gel de resolução e 5% de empilhamento de gel, sob condições não redutoras. Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue e mantidos a incubar durante 15 h à temperatura ambiente sob agitação suave.

2.12 Caracterização bioquímica

2.12.1 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da proteinase

Para avaliar o efeito de inibidores e íons metálicos a atividade de protease, o extrato bruto (150 µl) foi precipitado e precipitado com acetona, resuspenso com 150 µL de soluções de Fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), Beta-Mercaptoetanol e iões Fe^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Mn^{+2} e Co^{+2} a 0,2 M durante 30 minutos.

2.12.2 Efeito do pH e temperatura na atividade da protease

O pH ótimo foi determinado por resuspensão dos extratos em diferentes tampões com diferentes pHs: tampão acetato 0,2 M a pH 5,0 e 6,0 tampão Tris-HCl 0,2 M a pH 7,0, 8,0 e 9,0. Os extratos foram submetidos a diferentes temperaturas de reação de 25 ° C a 70 ° C em intervalos de 5 ° C.

2.12.3 Determinação da termoestabilidade

O extrato parcialmente purificado foi submetido a diferentes temperaturas variando de 5 ° C, de 25 ° C a 70 ° C por 60 minutos e realizando a mensuração das atividades.

3 Resultados e discussão

3.1 Produção Enzimática

Fatores como umidade, temperatura, tipo de extração e tempo de incubação foram estudados visando otimizar a produção de protease. *A. sydowii* foi capaz de produzir uma protease (extrato bruto) com alta atividade (atividade específica de 8,59 U / mg e um conteúdo proteolítico de 89,8 mg / mL). A

umidade, a temperatura e o tempo de incubação apresentaram a melhor produção a 60%, 30 °C e 5 dias, respectivamente, em comparação com as demais condições testadas. Os dados também demonstram que o cafeeiro é um substrato valioso para a produção de proteases, uma vez que 4 g de resíduo de café foram suficientes para produzir 1,16 mg / mL de protease com 256 U / mL de atividade.

3.2 Purificação enzimática

A purificação parcial por precipitação com acetona concentrada e conseqüentemente aumentou a atividade específica da protease (ver tabela 1). Neste passo, a enzima foi recuperada em 93% com purificação de 2,11 vezes. Novelli et al. (2015) [11] usando farelo de trigo e farelo de soja como substrato para fermentações por *Aspergillus* não excedeu o valor de 40 U / mL de atividade de protease com esta etapa de pré-purificação.

Os dois passos cromatográficos subsequentes (cromatografia de troca aniônica e filtração em gel) melhoraram a pureza da enzima, refletiram na recuperação e rendimento da enzima e na obtenção de um único pico ativo. Para isso, a enzima parcialmente purificada foi aplicada em uma coluna DEAE-Sephadex G50, resultando na obtenção de duas frações de proteases eluídas com NaCl (1M). A fração proteica eluída, correspondente aos picos destacados na figura 1, mostrou uma purificação de 4,09 vezes (atividade específica de 242 U / mg). Além disso, os picos ativos foram concentrados e depois submetidos a uma coluna Superdex G-200, o que resultou em um padrão variado de proteína, porém com uma única fração de protease. Essa fração foi selecionada e reintroduzida na mesma coluna Superdex 75, obtendo um único pico ativo com 51% de recuperação de protease e 5,94 vezes de purificação (atividade

específica de 352 U / mg). O pico isolado obtido no cromatograma 2 (Fig.2) foi correlacionado a uma banda de 48 kDa na eletroforese, mostrando uma fração enzimática homogênea sob condições não redutoras (Fig. 4).

3.3 Efeitos de inibidores e metais na atividade da protease

A Figura 3 mostra a influência de inibidores e íons metálicos na atividade da protease. Entre os inibidores, PMSF e EDTA apresentaram os maiores níveis de inibição, diminuindo a atividade residual para 30,4% e 45,7% de seu valor inicial, respectivamente. Uma inibição de 70% da atividade da protease pelo PMSF indica que a enzima é uma serina protease.

Entre os íons metálicos, a presença de $\text{Cu} + 2$ e $\text{Zn} + 2$ proporcionou a menor atividade residual de protease, com 43,5% (53 U / mL) e 47,3% (58 U / mL), respectivamente. O íon $\text{Ca} + 2$, em contraste, aumentou em 30% a atividade residual da protease, atuando como um indutor de atividade (tabela 2). Segundo Coelho et al. (2008) [12] a atividade catalítica de diversas enzimas depende de moléculas menores, não proteico conhecido como cofatores podendo ser divididas em dois grupos ou classes: coenzimas e íons metálicos.

Negi e Banerjee (2009) [13] purificaram uma protease de *Aspergillus awamori* e não encontraram inibição usando PMSF e EDTA. Sobre a atividade sob presença de íons metálicos, o Zn^{+2} promoveu um ligeiro aumento na atividade, diferente dos dados apresentados neste trabalho.

Tanto a inibição do PMSF quanto do EDTA, ocorre inibição, porém a inibição completa da protease pelo PMSF é altamente indicativa da presença do resíduo serina no sítio ativo [15], embora a inibição pelo EDTA possa levar a uma interpretação errônea das causas da inibição, uma vez que grande número

de enzimas requer cálcio para sua atividade, e o EDTA como quelante pode impedir o efeito do cálcio.

3.4 Efeitos da temperatura e do pH na atividade e estabilidade da protease

A temperatura para a atividade máxima da protease foi de 45 ° C para todos os extratos, porém a atividade foi abruptamente diminuída no intervalo de 5°C, alcançando um decréscimo de até 77% (para o extrato bruto). A estabilidade térmica é um fator essencial para a aplicação de proteases. A proteína aqui estudada foi ativa e termoestável de 25°C a 55°C (baixos níveis de atividade foram mantidos até 60 ° C).

Em trabalho realizado com vários fungos *A. oryzae* e *A. flavipes*, a atividade de protease manteve-se estável até 50 ° C, quando houve declínio acentuado da atividade, possivelmente devido à desnaturação da protease [13]. Esses dados corroboram os dados apresentados neste trabalho.

Em relação à temperatura ótima foi observada a 40 ° C mostrou uma atividade proteolítica de 478 U / mL como mostrado na Figura 3. Resultados semelhantes foram encontrados na protease fúngica derivada da fermentação de *A. flavipes* com a temperatura ótima sendo 50°C [13], e *Myceliophthora* sp. com temperatura ótima estava entre 40-45 ° C [16].

A figura 3 mostra que o pH ótimo para os extratos bruto e purificado. A enzima manteve atividade considerável durante 1 hora de incubação em pHs entre 5,0 e 9,0, embora sob condições ácidas a atividade estivesse constantemente diminuída. O pH 8 proporcionou os melhores níveis de atividade para todos os extratos, o que evidencia o caráter alcalino da enzima, embora próximo ao pH neutro, já que após o pH 9 as atividades de todos os extratos

diminuíram abruptamente. Isso torna a protease adequada para aplicações em ambientes neutros e alcalinos.

De acordo com estudos usando *A. fumigatus* foi mostrado um pH ótimo entre 7,5 e 8 [17] e *A. oryzae* com o pH ótimo entre 8-9 mas mantendo um alto índice de atividade entre pH 5-9 e *A. flavipes*, o pH ótimo foi 8, com bom desempenho na atividade enzimática na faixa de pH 7-9 [13]. Resultados semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Esta ampla gama de pH de proteases produzidas deve ser devida à capacidade do gênero *Aspergillus* de se adaptar a uma ampla gama de pH [17,18] essa capacidade é devido a capacidade que esse fungo tem de modificar o ambiente deixando mais favorável ao seu desenvolvimento.

Figures

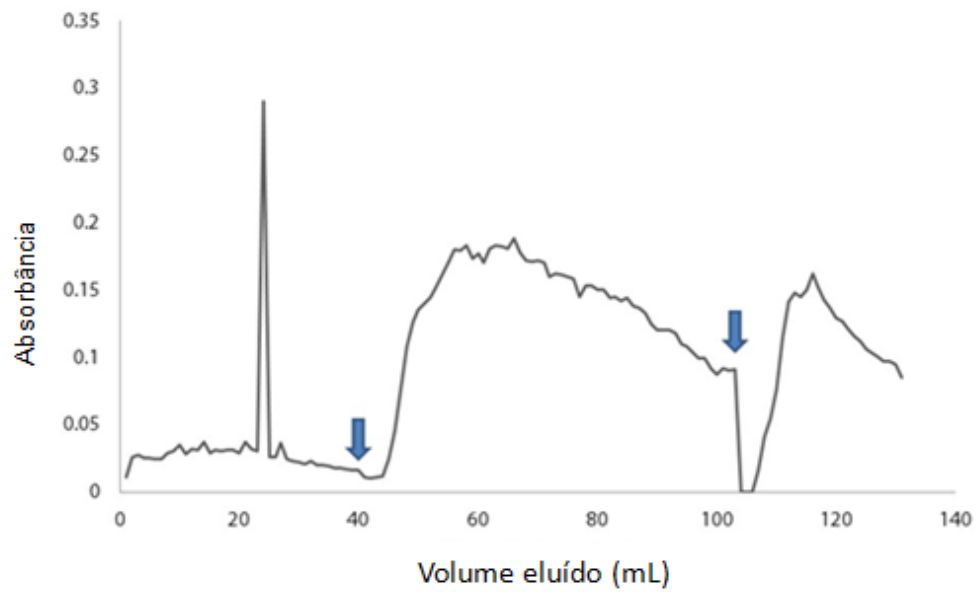


Fig 1. Perfil de eluio da cromatografia de troca aniica de DEAE-Sephadex. As marcas mostram as frações contendo a atividade da protease.

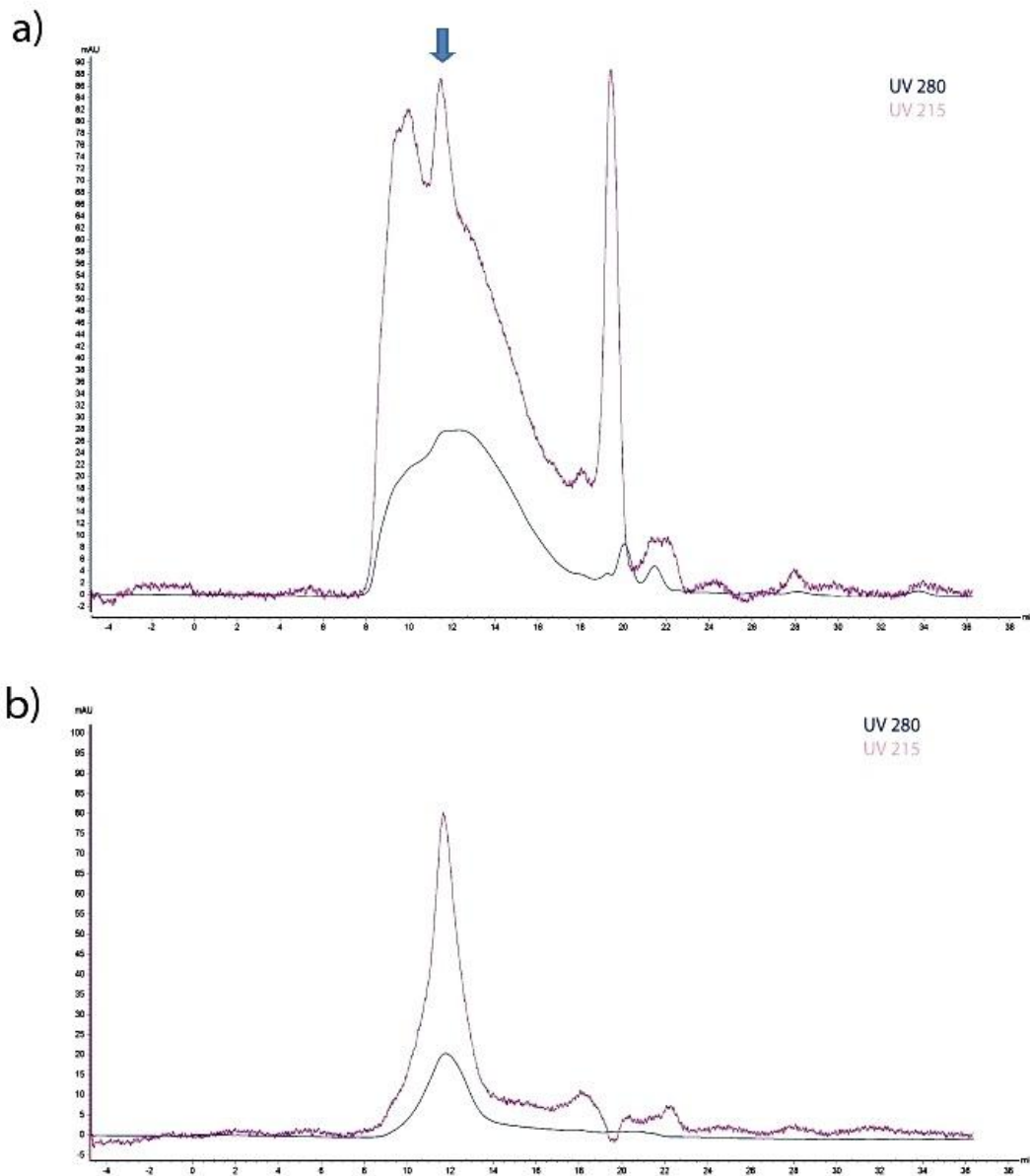


Fig 2. Perfil de eluição do sistema Superdex 75 FPLC. a) Primeira execução: Cromatograma contendo picos variados de proteína com o pico de protease apontado. b) Segunda execução: fração isolada contendo o pico de protease encontrado em a).

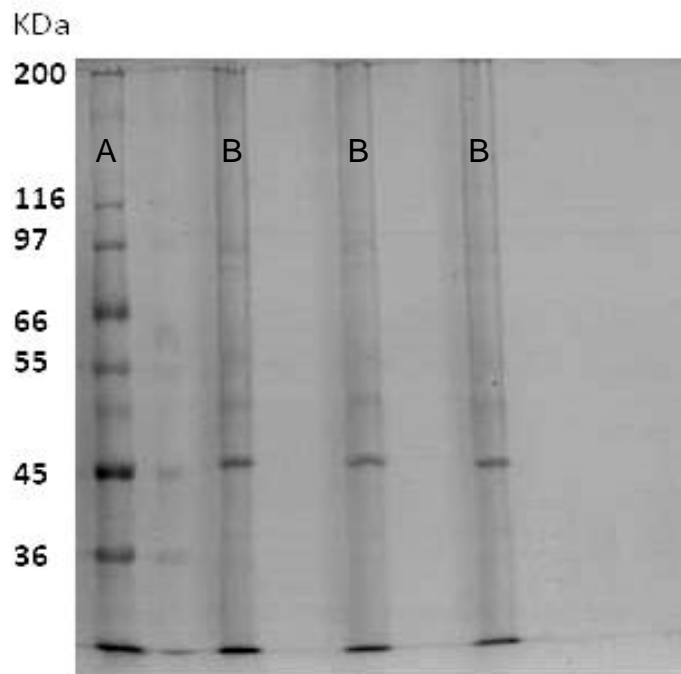


Fig 3. Eletroforese (SDS-PAGE.) Marcador (A) e Amostra Purificada (B)

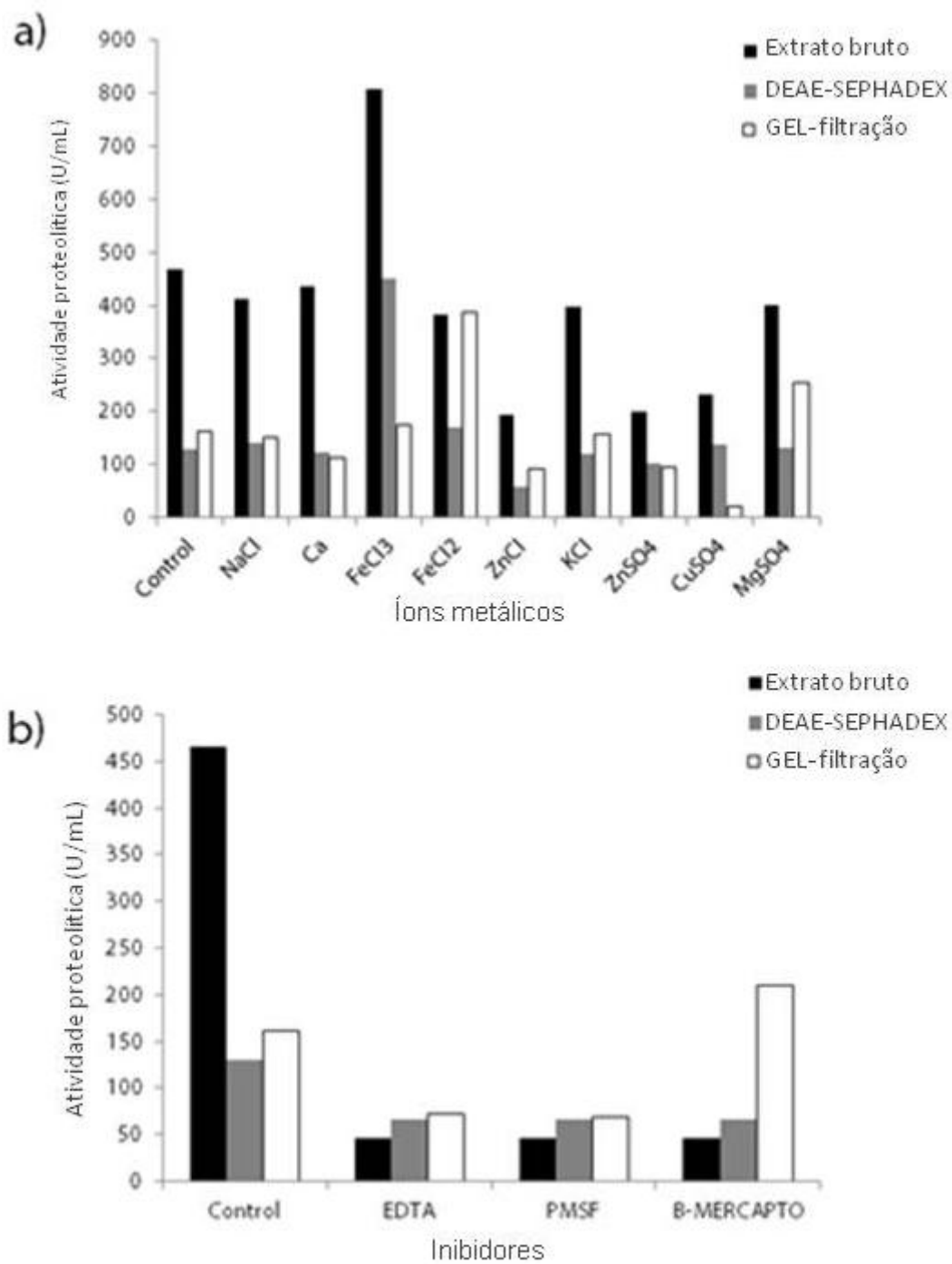


Fig 4. Efeito de íons metálicos e inibidores na atividade da protease.

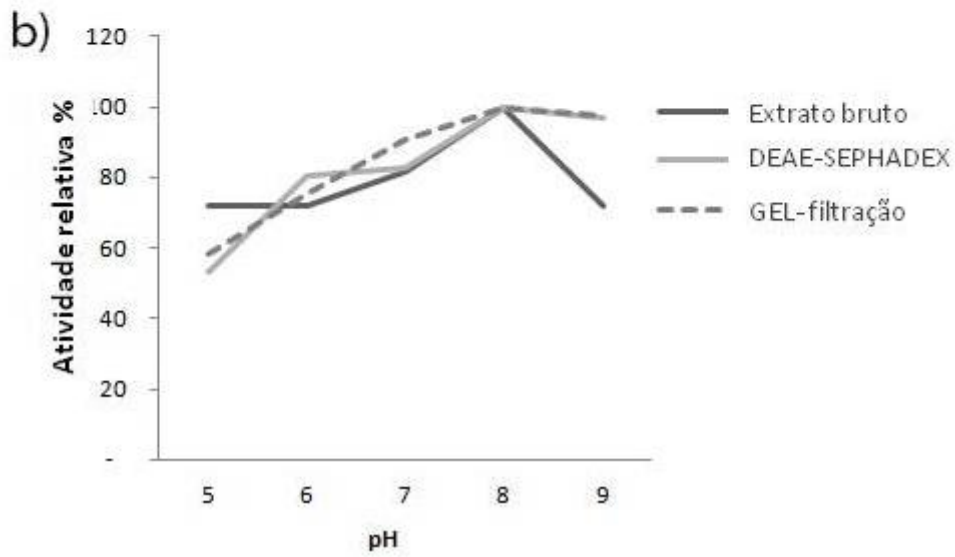
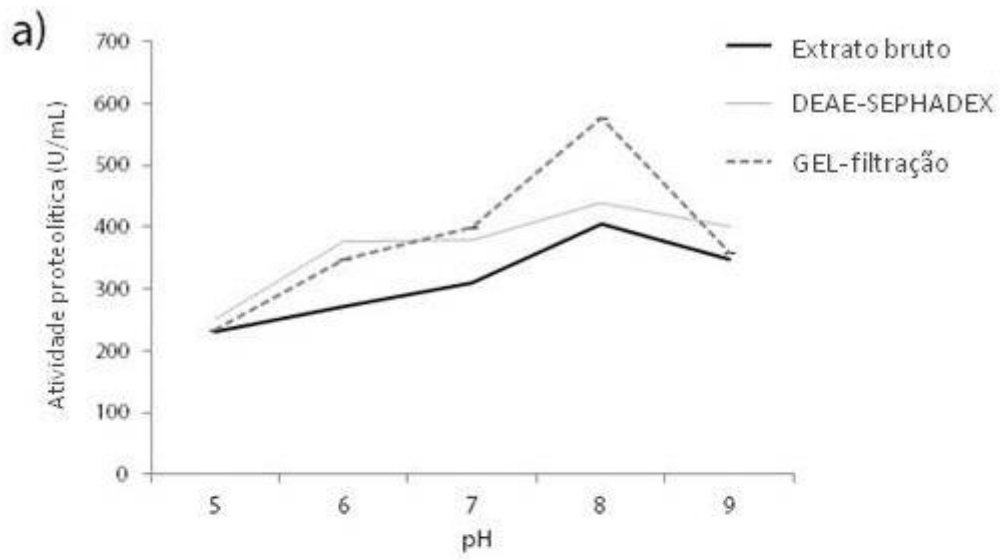


Fig 5. PH ótimo (a) e estabilidade de pH (b) dos extratos bruto e purificado.

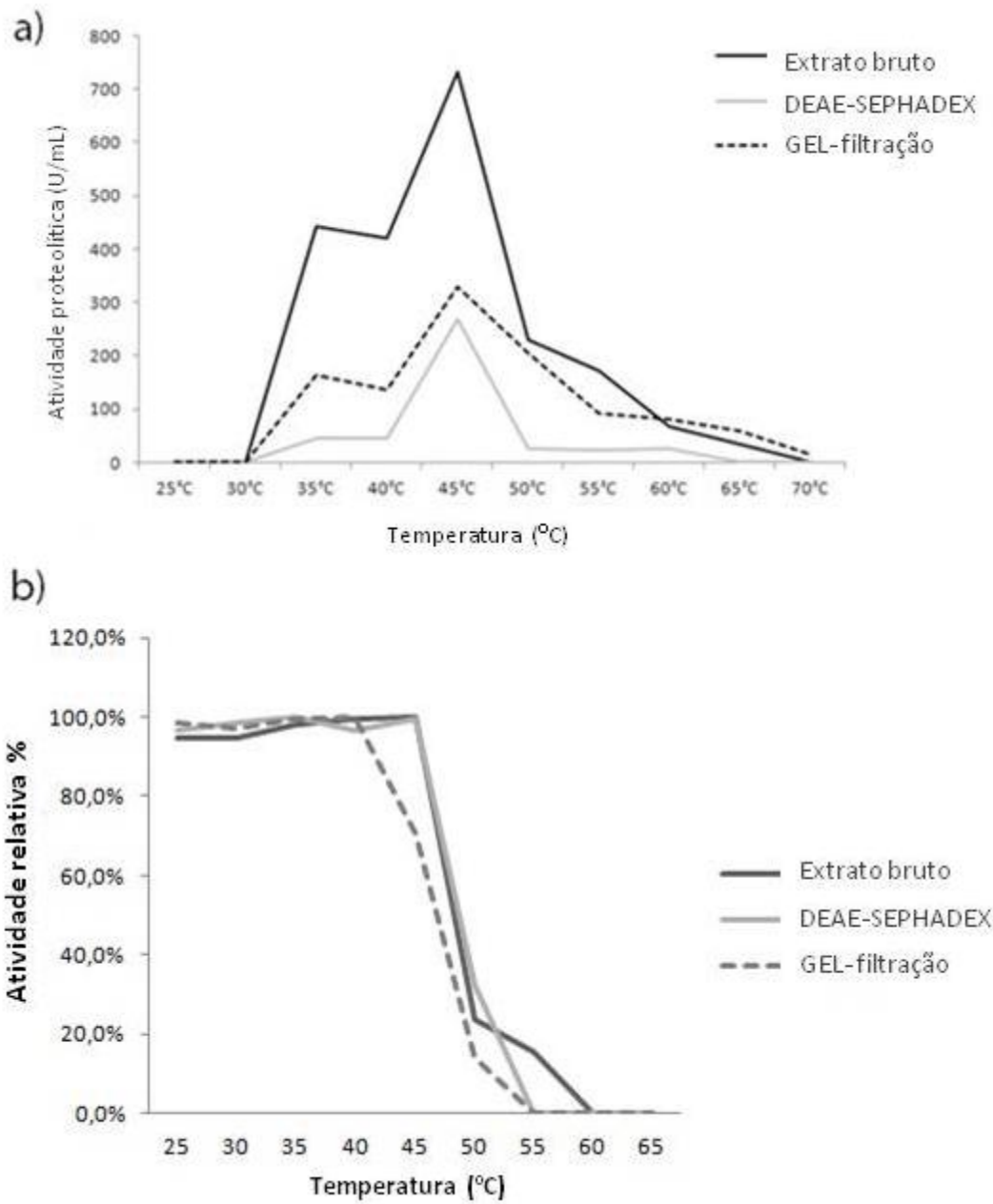


Fig 6. Temperatura ótima (a) e estabilidade de temperatura (b) dos extratos bruto e purificado.

Tabelas

Tabela 1. Etapas de purificação da protease de *Aspergillus sydowii*

Etapas da Purificação	Atividade Total (U)	Total de proteínas (mg)	Atividade específica (U/mg)	Purificação (Fold)	Recuperação (%)
Extrato bruto	500	89.8	59	1	100
Precipitado cetônico	465	30	125	2.11	93
DEAE-Sephadex	136	0.95	242	4.09	27
Superdex 75	256	1.16	352	5.94	51

CONCLUSÃO

A enzima de *Aspergillus sydowii* produzida por fermentação em estado sólido usando resíduos de café foi aqui purificada e provou ter um potencial biotecnológico para uso na indústria de detergentes e amaciamento de couro, bem como uma possível solução para o ambiente de impacto causado pelas borras de café do descarte. Os resultados aqui apresentados podem ser úteis para a indústria de enzimas, uma vez que representam uma maneira de gerenciar o desperdício de conversão bruta em um produto econômico viável.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FACEPE (Fundação de Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) pelo financiamento do presente estudo.

References bibliográficas

- [1] Zambare V, Nilegaonkar S, Kanekar P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: Enzyme production and its partial characterization, *N.Biotechnol.* 2011;28,173–181.
doi:10.1016/j.nbt.2010.10.002.
- [2] Castro, R.J.S, Nishide T.G, Sato H.H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2014;3, 236–245. doi:10.1016/j.bcab.2014.06.001.
- [3] Rao, M.B, Tanksale, A.M, Ghatge, M.S, Deshpande, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1998; 62, 597–635. doi:papers2://publication/uuid/E58ABF6D-8C97-4209-810D-A452EE30B2CD.
- [4] Sethi, B.K, Jana, A, Nanda, P.K, Das Mohapatra, P.K, Sahoo, S.L. Thermostable acidic protease production in *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10 using chickling vetch peels, *J. Taibah Univ. Sci.* 2016;10, 571–583. doi:10.1016/j.jtusci.2015.11.001.
- [5] Vishwanatha, K.S, Appu Rao, A.G, Singh, S.A. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010;85,1849–1859.
doi:10.1007/s00253-009-2197-z.
- [6] De Souza, P.M, Lisa, M, Bittencourt, D.A, Caprara, C.C, De Freitas, Paula, M. R. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases, *Brazilian J. Microbiol.* 2015;346, 337–346. doi:dx.doi.org/10.1590/S1517-838246220140359.

- [7] Zenebon., O., Pascuet, N.S., Tiglia, P., 2008 Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, São Paulo.
- [8] DIAS, D. R. et al. Management and utilization of wastes from coffee processing. In: SCHWAN, R. F.; FLEET, G. H. (Org.). Cocoa and coffee fermentations. Boca Raton: CRC Taylor & Francis, 2014. Cap. 15, p. 376-382.
- [8] Ginther, C.L. Sporulation and the Production of Serine Protease and Cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979;15, 522–526. doi:10.1128/AAC.15.4.522.
- [9] Smith, D, Krohn, P.K, Hermanson, R.I, Mallia, G.T, Gartner, A.K, Provenzano, F.H, Fujimoto, M.D, Goeke, E.K, Olson, N.M, Klenk, B.J. Measurement of protein using bicinchoninic acid.pdf, *Anal. Chem.* 1989;150, 76–85.
- [10] Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature.* 1970;227, 680–685.
- [11] Novelli, P.K, Barros, M.M, Fleuri, L.F. Novel inexpensive fungi proteases: Production by solid state fermentation and characterization, *Food Chem.* 2016;198, 119–124. doi:10.1016/j.foodchem.2015.11.089.
- [12] COELHO, R. R. R.; NASCIMENTO, R. P. Seleção de actinomicetos produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A; COELHO, R. R. R. (Ed.). *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado.* Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 3, p. 71-94.
- [13] Negi, S, Banerjee, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor, *Food Res. Int.* 2009;42, 443–

448. doi:10.1016/j.foodres.2009.01.004.
- [14] Asker, M.M.S, Mahmoud, M.G, El Shebwy, K, Abd el Aziz, M.S. Purification and characterization of two thermostable protease fractions from *Bacillus megaterium*, J. Genet. Eng. Biotechnol. 2013;11, 103–109. doi:10.1016/j.jgeb.2013.08.001.
- [15] Zanphorlin, L.M, Cabral, H, Arantes, E, Assis, D, Juliano, L, Juliano, M.A. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp., Process Biochem. 2011;46, 2137–2143. doi:10.1016/j.procbio.2011.08.014.
- [16] Markaryan, A, Morozova, I, Yu, H, Kolattukudy, P.E. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung., Infect. Immun. 1994;62, 2149–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/186491>.
- [17] van der Straat, L, Vernooij, M, Lammers, M, van den Berg, W, Schonewille, T, Cordewener, J, et al. Expression of the *Aspergillus terreus* itaconic acid biosynthesis cluster in *Aspergillus niger*, Microb. Cell Fact. 2014;13, 11. doi:10.1186/1475-2859-13-11.
- [18] Yin, L.-J, Hsu, T.-H, Jiang, S.-T. Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720., J. Agric. Food Chem. 2013;61, 662–6. doi:10.1021/jf3041726.