



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

LÍGIA MARIA GONÇALVES FERNANDES

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE
Aspergillus heteromorphus URM 0269 E SUA IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO**

RECIFE

2020

LÍGIA MARIA GONÇALVES FERNANDES

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE
Aspergillus heteromorphus URM 0269 E SUA IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO**

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Biociência
Animal da Universidade Federal Rural de
Pernambuco para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Souza Porto
Coorientadora: Dra. Márcia Nieves C. da Cunha

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F363p

Fernandes , Lígia Maria Gonçalves

PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 E SUA IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO / Lígia Maria Gonçalves Fernandes . - 2020.

105 f. : il.

Orientadora: Tatiana Souza Porto.

Coorientadora: Marcia Nieves Carneiro da Cunha.

Inclui referências.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.

1. *Aspergillus heteromorphus*. 2. Protease colagenolítica. 3. Imobilização enzimática. 4. Alginato de cálcio. 5. Sistema de duas fases aquosas (SDFA). I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Cunha, Marcia Nieves Carneiro da, coorient. III. Título

CDD 636.089

Lígia Maria Gonçalves Fernandes

**PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES COLAGENOLÍTICAS OBTIDAS DE
Aspergillus heteromorphus URM 0269 E SUA IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO**

**Dissertação de Mestrado defendida e aprovada pela
BANCA EXAMINADORA**

Data da aprovação: 14 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Tatiana Souza Porto – Presidente/Orientadora
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE

Prof. Dr. Osmar Soares da Silva
Escola de Referência de Ensino Médio Azarias Salgado/ EREMAS - SEE/PE

Profa. Dra. Raquel Bezerra Pedrosa
Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE

Prof. Dr. Vagne de Melo Oliveira
Universidade Federal Rural de Pernambuco– UFRPE

Dedico este trabalho a minha mãe, por nunca ter medido esforços para me dar a melhor educação que estava ao seu alcance, mesmo em tempos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar o meu caminho, por me proteger do mal e por sempre me guiar. Obrigada por tudo... pelo ar que respiro, pela comida na mesa, pela minha saúde, pela família que tenho, pelas pessoas que já passaram e que passarão na minha vida e principalmente por ter resiliência nos momentos difíceis.

A minha orientadora Profa. Dra. Tatiana Souza Porto pela confiança e por oportunizar trabalhar na área de biotecnologia. Agradeço por ter acreditado no meu potencial e abrir portas quando todos fechavam. Obrigada por ser sempre acessível, por sentar ao meu lado e discutir cada centímetro do meu trabalho e por todo aprendizado. Obrigada pelo conhecimento adquirido, pela compreensão, por ficar feliz com cada vitória alcançada, pela amizade construída e por fazer parte da minha história. Um ser humano maravilhoso e profissional incrível. Serei eternamente grata por tudo.

A minha Coorientadora Dra. Márcia Nieves C. da Cunha pela parceria, por me acompanhar nos experimentos, pela paciência, pelos ensinamentos e pela simplicidade nas resoluções. Obrigada por ficar feliz a cada passo que dava, por me ajudar a caminhar e vencer comigo todos os obstáculos que apareceram na minha jornada. Obrigada pela amizade e por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais Gilva e Alexandre pelo empenho em sempre me dar a melhor educação. A minha mãe por me ensinar o bem acima de tudo. Por ser um exemplo de honestidade e bondade. Obrigada por estar presente na minha vida por participar de cada conquista e por ter me educado tão bem. Obrigada por sonhar comigo e acreditar que tudo é possível quando temos Deus no coração. Eu te amo mais que qualquer coisa nesse mundo e tenho o maior orgulho de ser sua filha. Ao meu Pai que me ensinou a ser forte nos momentos difíceis, a ser perseverante e nunca desistir dos meus objetivos. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por sempre me ajudar, por acreditar e respeitar todas as minhas escolhas e principalmente, por se orgulhar de mim. Eu te amo infinitamente.

Ao meu marido Cezar pelo companheirismo e cumplicidade, por acreditar no meu potencial e por incentivar a buscar sempre o meu melhor. Por me tirar da zona

de conforto e me lembrar de que nada cresce lá. Obrigada por me alavancar e estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu irmão Alexandre Júnior e minha cunhada Andrea por estarem sempre na torcida de todas as minhas conquistas, por me presentear com três sobrinhos maravilhosos que tenho como filhos. Obrigada por permitir ser tão ativa na educação deles e pela confiança em mim depositada.

Aos meus queridos sobrinhos/filhos, Alexandre Neto, Taís Gabriele e João Pedro. Por todo amor envolvido, por aceitar que faça parte da vida de vocês integralmente. Obrigada por permitirem que os eduquem e por confiar em tudo que faço por vocês na certeza que estou dando sempre o meu melhor. Pelas brincadeiras, risadas, filmes, por se preocuparem comigo e por serem pessoas tão especiais. Obrigada pela presença marcante na minha vida. Sou mais feliz ao lado de vocês.

As minhas enteadas Thamilly e Thayná por deixarem meus dias mais leves, pelas risadas, pelas confidências, pelas guloseimas, por permitirem a participação ativa na vida de vocês e por confiarem no meu potencial.

A minha tia Lígia que com sua alegria contagiante deixou meus dias nublados ensolarados e pela presença tão marcante na minha vida. Ao meu tio Edvaldo por ajudar a construir meu lado crítico e pelas conversas cheias de sabedoria. Aos meus primos Clóvis e Amanda por se alegrar comigo a cada meta alcançada. Sempre serão minha segunda família.

A Profa. Dra. Ana Porto por ter me acolhido tão bem e permitir a realização dos experimentos dessa dissertação no Labtecbio e Labiopro.

Aos anjos do Labtecbio, Dr. Vagne Oliveira, Dr. Romero Brandão, Dra. Juanize Batista e Dr. Thiago Nascimento que tanto me ajudaram. Obrigada por estarem sempre prontos para as inúmeras dúvidas que aparecem em todo processo da pesquisa. Cada um contribuiu de forma especial no meu aprendizado.

Ao Dr. Jônatas Silva, Dr. Rodrigo Oliveira e ao Dr. Osmar Silva pelo auxílio e esclarecimento com as metodologias e experimentos. Obrigada por sempre estarem disponíveis para as dúvidas que apareciam.

A todos os meus amigos do Labtecbio, por proporcionar um ambiente salutar com muitas risadas, trabalho e conversas. Lá aprendemos a crescer juntos, na certeza do bem comum.

A Profa. Dra. Galba Takaki, Dra. Adriana Souza e MSc. Vanessa Pimentel por abrirem as portas da Universidade Católica de Pernambuco e por me ajudarem no processo de pesquisa.

As minhas amigas Munique, Claudiane e Ana Neri, por estarem na torcida da minha evolução acadêmica, por acreditarem na minha capacidade e por ficarem feliz com a minha felicidade. Obrigada por não permitirem que o tempo e os atropelos da vida nos afastassem. Tenho um carinho imensurável por cada uma de vocês.

Aos meus queridos amigos da escola Costa Pinto, Renata, Ygor, Mariana, Leandro, Jeissy e Danilo. Obrigada por deixarem meus dias mais leves, por terem sido tão presentes na minha ausência. Vocês são demais. Um agradecimento especial a Renata, a irmã que Deus me deu. Obrigada por me incentivar e ter feito as primeiras conexões para que tudo isso fosse possível. Não me vejo sem a presença de vocês na minha vida.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e a Coordenação da Pós-Graduação em Biociência Animal, pelo incentivo acadêmico.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Degradação do colágeno.	23
Figura 2: <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269. Conidióforo (1); Métulas (2); Vesícula (3), Fiálides (4), Conídios (5). Aumentado 40X.	27
Figura 3: Crescimento radial de <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM0269 em meio de cultivo batata dextrose ágar.....	28
Figura 4: Esquema do sistema de duas fases aquosas (SDFA) PEG/Sal.....	35
Figura 5: Fatores que afetam a imobilização enzimática	38
Figura 6: Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação.....	39
Figura 7. Mecanismo básico para a formação de esferas de alginato de cálcio.....	42

CAPÍTULO I

Figura 1: Reutilização em atividade proteolítica da enzima produzida por <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 e imobilizada em esferas de alginato de cálcio (CaCl ₂ 0,6M, Alginato de sódio 4%)	73
Figura 2. Caracterização bioquímica parcial da protease produzida por <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 livre e imobilizada. (A) Temperatura ótima da enzima livre e imobilizada, (B) Estabilidade a diferentes temperaturas da enzima livre e imobilizada no tempo de 180 minutos, (C) pH ótimo da enzima livre e imobilizada, (D) Estabilidade a diferentes pH da enzima livre e imobilizada no tempo de 24 horas.....	75

CAPÍTULO II

- Fig. 1. Diagram of geometric interpretation of the interaction between citrate concentration (C_{CIT} , % w/w) and PEG molar mass (M_{PEG} , g/mol) on the activity yield (Y) in the top phase (A), and on the purification factor (PF) in the top phase (B).....92
- Fig. 2. Biochemical characterization of protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 extracted by Aqueous Two-Phase System PEG/Citrate. (A) Relative activity profile versus pH, (B) Effects of pH on the stability of the protease, (C) Relative activity profile versus temperature and (D) Effect of temperature on the stability of the protease93
- Fig. 3. Azocasein hydrolysis by protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in aqueous two-phase system PEG/Citrate. Solid line represents the fitting curve drawn according to Michaelis-Menten equation ($R^2 = 0.95$). Arrhenius-type semi-log plot of initial activity versus the reciprocal temperature [$R^2 = 0.98$ (E^*); and 0.99 (ΔH_u^0)]......96
- Fig. 4. Semi-log plots of thermal denaturation of protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in aqueous two-phase system PEG/Citrate97

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Produção de proteases com atividade colagenolítica de alguns fungos do gênero <i>Aspergillus</i> em diferentes tipos de fermentação	24
Tabela 2. Proteases produzidas por <i>Aspergillus</i> a partir de resíduos orgânicos utilizados como substrato na fermentação em estado sólido.....	33
Tabela 3: Imobilização de enzimas em alginato com seus respectivos rendimentos e aplicações industriais.....	43

CAPÍTULO I

Tabela 1. Resultados do planejamento fatorial 2^2 para imobilização de protease colagenolítica de <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM0269 em esferas de alginato.....	71
Tabela 2. Efeito estatístico calculado para as variáveis respostas do planejamento fatorial 2^2 para imobilização da protease colagenolítica de <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269	72

CAPÍTULO II

Table 1. Factors levels used in the 2^4 experimental design selected for protease extraction by the PEG/Citrate ATPS.	84
--	----

Table 2. Extraction of collagenolytic protease from <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 using factorial design 2^4 by aqueous two-phase systems.....	89
Table 3. Effects and interactions of <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 collagenase extraction by aqueous two-phase systems PEG/Citrate using a factorial design 2^4	90
Table 4. Effects of inhibitors and metal ions on the proteolytic activity	95
Table 5. Kinetic and thermodynamic parameters of thermoinactivation of a novel <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 protease in ATPS PEG/Citrate at different temperatures.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ - lambda (comprimento de onda)

ATPS - Aqueous Two-Phase Systems

BSA - Albumina de SoroBovino

CA - Collagenase Activity

CCIT - Citrate Concentration

CPEG - PEG concentration

E - Energia de Ativação

Ed - Energia de desativação

EC - Comissão Internacional de Enzimas

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FES - Fermentação em Estado Sólido

FS - Fermentação Submersa

K - Coeficiente de partição

K_M - Constante de Michaelis-Menten

MPEG - PEG molar mass

PEG - Polietilenoglicol

PMSF - Fluoreto de Metilfenilsulfonil

PF - Purification Factor

SDFA - Sistema de Duas Fases Aquosas

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SFm - Submerged Fermentation

SSF - Solid State Fermentation

TCA - ÁcidoTricloacetico

TLCK - Tosil lysine chloromethyl ketone

TPCK - Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone

URM - Universidade Recife Micoteca

V_{max} - Velocidade Máxima

WFCC - World Federation for Culture Collections

Y - Activity yield

ΔG^* - Energia livre de Gibbs

ΔH^* - Entalpia

ΔS^* - Entropia

RESUMO

Este trabalho objetivou produzir, imobilizar em alginato de cálcio, extrair em sistemas de duas fases aquosas (PEG/Citrato) e caracterizar proteases colagenolíticas obtidas de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269. Para tanto, no primeiro momento, realizou-se uma fermentação em estado sólido (planejamento fatorial 2^2); obtendo-se a melhor condição de produção (3g de farelo de trigo e 20% de umidade, submetidos a 30°C após 96 horas de fermentação, com atividade proteolítica e colagenolítica de 41,36 U/mL e 401,06 U/mL, respectivamente). A protease colagenolítica contida no extrato enzimático foi imobilizada por aprisionamento em esferas de alginato, sendo realizado um planejamento fatorial 2^2 onde foi obtido as melhores condições (CaCl_2 0,6M; Alginato de sódio 4%), apresentando rendimento de 82,82% para atividade proteolítica e 94,58% de atividade colagenolítica. Esta enzima imobilizada reteve mais de 40% da atividade residual no terceiro ciclo e apresentou 36,82% de perda da atividade após 7 dias de armazenamento a 4°C. Também foram analisados pH e temperatura ótima, bem como as estabilidades. No segundo momento, foi realizado um planejamento fatorial (2^4) para purificação da protease colagenolítica utilizando o Sistema de duas fases aquosas (SDFA), tendo como variáveis independentes: massa molar de PEG (M_{PEG}), concentração de PEG (C_{PEG}), concentração de citrato de sódio (C_{CIT}) e pH. Posteriormente, a protease extraída por SDFA foi utilizada para hidrólise da azocaseína e caracterizada em termos de parâmetros bioquímicos, cinéticos e termodinâmicos. A enzima foi particionada preferencialmente para a fase rica em PEG cujo maior fator de purificação e recuperação (PF = 7.8 e Y= 157.5%) foi obtido usando M_{PEG} 8000 g/mol, C_{PEG} 24%, C_{CIT} 15% e pH 8,0, apresnetando-se estável a temperaturas de 10 a 30°C e condições de pH de 5,0 a 6,0. A enzima particionada foi inibida parcialmente por PMSF. Os parâmetros cinéticos de ativação para hidrólise da azocaseína revelaram afinidade por azocaseína ($K_M = 2,8$ mg/mL) com taxa máxima de catálise de 45,0 U/mL. A energia de ativação da reação e a variação de entalpia padrão do desenvolvimento da enzima foram de 24,2 e 54,2 kJ/mol, respectivamente. A hidrólise de caseína catalisada por protease a 25°C mostrou energia livre de Gibbs de ativação, entalpia e entropia de 65,8 kJ/mol, 21,8 kJ/mol e -146,7 J/mol.K, respectivamente. Os parâmetros termodinâmicos da termoinativação da protease no SDFA sugerem um mecanismo predominante de desdobramento reversível, uma vez que a inativação da energia livre de Gibbs aumentou de 91,0 para 102,3 kJ/mol. A fermentação em estado sólido foi eficaz com alta produção enzimática e a imobilização da protease colagenolítica em alginato de cálcio, mostrou ser um método eficiente no rendimento, armazenamento e reuso da enzima. Através de um processo rápido e econômico, a enzima foi purificada por SDFA, permitindo a remoção de contaminantes no extrato enzimático obtido de *Aspergillus heteromorphus* URM0269. Esses resultados indicam o potencial da protease colagenolítica a ser explorada em aplicações biotecnológicas, como nas indústrias de curtume, de tenderização de carnes e uso biomédico.

Palavra-chave: *Aspergillus heteromorphus*, Protease colagenolítica, Fermentação em Estado sólido, Imobilização, alginato de cálcio, SDFA

ABSTRACT

This work aimed to produce, immobilize in calcium alginate, extract in two-phase aqueous systems (PEG/Citrate) and characterize collagenolytic proteases obtained from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269. Therefore, in chapter I, a solid state fermentation was carried out using a factorial design 2^2 ; the best production condition was: 3g of wheat bran, 20% moisture, submitted to 30°C after 96 hours of fermentation, with a proteolytic and collagenolytic activity of 41.36 U/mL and 401.06 U/mL, respectively. The collagenolytic protease contained in the enzymatic extract was immobilized by imprisonment in alginate beads, and a factorial design 2^2 was carried out where the best conditions were obtained (0.6M CaCl₂; 4% sodium alginate) for further analysis of yield, reuse, stability of storage and biochemical characterization. In this best test there was a yield of 82.82% for proteolytic activity and 94.58% of collagenolytic activity. This immobilized enzyme retained more than 40% of the residual activity in the third cycle and showed only 36.82% loss of activity after 7 days of storage at 4°C. Optimum pH and temperature, as well as stability, were also analyzed. In chapter II, a factorial design (2^4) was carried out for purification of the collagenolytic protease using the aqueous two-phase system (ATPS), where it was possible to evaluate the interaction of the independent variables: molar mass of PEG (M_{PEG}), concentration of PEG (C_{PEG}), sodium citrate concentration (C_{CIT}) and pH. Subsequently, the protease extracted by ATPS was used for the hydrolysis of azocasein and characterized in terms of biochemical, kinetic and thermodynamic parameters. The enzyme was preferentially partitioned for the PEG-rich phase whose greatest purification and recovery factor (PF = 7,8 and Y = 157,5%) was obtained using M_{PEG} 8000 g / mol, C_{PEG} 24%, C_{CIT} 15% and pH 8,0. Although the enzyme acted ideally at 50°C and pH 8,0, it was more stable at lower temperatures (10-30 °C) and acidic pH conditions (5.0-6.0). The purified enzyme was inhibited by PMSF, classifying it as a serine protease. The kinetic activation parameters for azocasein hydrolysis revealed greater affinity for azocasein (KM = 2.8 mg / mL) with a maximum catalysis rate of 45.0 U/mL. The reaction activation energy and the standard enthalpy variation of the enzyme development were 24.2 and 54.2 kJ/mol, respectively. Protease catalyzed hydrolysis at 25°C showed Gibbs free energy of activation, enthalpy and entropy of 65.8 kJ/mol, 21.8 kJ/mol and -146.7 J/mol.K, respectively. The thermodynamic parameters of the protease thermoactivation in the ATPS suggest a predominant reversible unfolding mechanism, since the inactivation of Gibbs free energy increased from 91.0 to 102.3 kJ/mol. Solid state fermentation was effective with high enzymatic production. The immobilization of collagenolytic protease in calcium alginate, proved to be an efficient method in the yield, storage and reuse of the enzyme. Through a fast and economical process, the enzyme was purified by ATPS, allowing the removal of contaminants in the enzymatic extract obtained from *Aspergillus heteromorphus* URM0269. These results indicate the potential of collagenolytic protease to be explored in biotechnological applications, such as in the tannery and detergent industries.

Keyword: *Aspergillus heteromorphus*, collagenolytic protease, solid state fermentation, Immobilization, Calcium alginate, ATPS

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1. Proteases	20
2.1.1 Proteases com atividade colagenolítica	22
2.2. O gênero <i>Aspergillus</i>	25
2.2.1. <i>Aspergillus heteromorphus</i>	27
2.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)	29
2.3.1. Fermentação em estado sólido com <i>Aspergillus</i>	32
2.4. Sistema de duas fases aquosas – SDFA	34
2.5. Imobilização enzimática	37
2.5.1 Imobilização enzimática em Alginato de Cálcio	41
3. OBJETIVOS	44
3.1. Objetivo Geral	44
3.2. Objetivo específico	44
4. REFERÊNCIAS	45
CAPÍTULO I:	62
Imobilização de protease colagenolítica de <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 em alginato de cálcio	62
CAPÍTULO II:	78
Extraction of a novel <i>Aspergillus heteromorphus</i> URM 0269 protease by aqueous two-phase systems PEG/citrate: a kinetic and thermodynamic study	78
5. CONCLUSÃO	105

1. INTRODUÇÃO

Compreender a dinâmica biocatalítica enzimática em relação ao aliada aos aspectos econômicos é a forma mais adequada de utilização deste aditivo nos setores industriais alimentícios (bebidas, rações), de produtos de limpeza e higiene, farmacêuticos e nutracêuticas, biomédicos e medicinais, na remediação de ambientes impactados, nos de produção de bicompostíveis e outras de menor escala.

O mercado mundial de enzimas estima um crescimento anual de aproximadamente 7,2% entre o período de 2019 a 2025 (RESEARCH AND MARKETS, 2019). Este incremento deve-se ao aumento da demanda deste mercado que tem se tornado um dos principais alicerces da economia global. Parte importante desse grupo de enzimas, as proteases representam até 60% do total das vendas globais, o que a coloca como o segundo dos três maiores grupos de enzimas industriais (SETHI et al., 2016; NINGTHOUJAM et al., 2009), atrás apenas das carboidratases na comercialização mundial (SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001).

As proteases são de natureza ubíqua e catalisam reações hidrolíticas, resultando na quebra de moléculas de proteínas em peptídeos e aminoácidos (SUMANTHA et al., 2006). Comparando com plantas e animais, os micro-organismos representam uma fonte atrativa dessas biomoléculas, uma vez que podem ser cultivados em grandes quantidades em curto período por métodos de fermentação já bem estabelecidos, produzindo assim, um fornecimento abundante e regular do produto desejado. Além disso, as proteases microbianas têm uma vida útil mais longa quanto às demais do mercado e podem ser armazenadas por longos períodos sem perda significativa de atividade.

Em geral, são secretadas diretamente no meio fermentativo extracelularmente pelo micro-organismo produtor, simplificando assim o processamento de separação e purificação da enzima em comparação com as proteases obtidas de plantas e animais (KUMAR; DUTT; GAUTAM, 2016).

Dentre as proteases existem as que possuem capacidade de clivar a tripla hélice do colágeno, a proteína mais abundante nos mamíferos. Esse tipo de proteína é importante no campo biomédico e terapêutico. Estas enzimas são classificadas como proteases colagenolíticas.

As proteases com atividade colagenolítica podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, sendo as microbianas as mais utilizadas devido a sua facilidade de manipulação, diversidade e sua interação específica com o colágeno (SALOMÃO, 2020).

Dentre os organismos que produzem proteases com atividade colagenolítica, os fungos filamentosos em se destacado devido sua facilidade de manipulação e resgate do produto desejado, além do procedimento ser de baixo custo e de fácil recuperação. Dentre os filamentosos, o gênero *Aspergillus* tem demonstrado amplo potencial e tem sido aplicado em diversas indústrias devido seu custo de produção ser baixo quando comparado com outras fontes microbianas, já que em técnicas de recuperação e separação de biomoléculas, o micélio pode ser extraído na filtração com facilidade, principalmente quando a fermentação é em estado sólido (FES) (INDRATININGSIH, PERTIWININGRUM; SUWARTI, 2013).

No mercado, as proteases produzidas por *Aspergillus* são conhecidas pelo fato de poder excretar alto índice enzimático no meio extracelular e quando são excretadas no meio de FES, potencializando a biocatálise, além de reduzir os rejeitos agroindustriais que muitas vezes serviriam apenas para aumentar o índice de poluição. Desta forma, essa atividade, além de ter uma importância industrial e biotecnológica, diminui o descarte impróprio de diversos rejeitos orgânicos.

Após a aquisição destas biomoléculas, é necessário que a enzima seja recuperada e purificada para melhor serem aplicadas nas indústrias. Partindo deste princípio, faz-se necessário um método de purificação enzimática, que geralmente aumenta o custo de produção. Nesse aspecto, são incentivadas investigações que utilizem métodos alternativos, rápidos, baratos e eficientes, como a extração líquido-líquido usando o particionamento bifásico através do sistema de duas fases aquosas (SDFA).

Dentre os principais problemas associados ao uso de proteases colagenolíticas numa escala industrial, está a dificuldade de sua separação da solução e sua inativação por solventes orgânicos e pH ou temperatura extremos, o que uma simples imobilização tornaria viável. Para muitas aplicações industriais, enzimas e células podem ser imobilizadas, por meio de protocolos de pouca complexidade e econômicos, para serem reutilizadas por longos períodos tempo. O uso de uma enzima imobilizada permite sua recuperação e reutilização, resultando em um processo economicamente viável (KUMAR et al., 2007). Os biopolímeros naturais à base de polissacarídeos usados na imobilização de enzimas representam uma classe principal de biomateriais, incluindo a agarose, dextrana, quitosana e alginato. Esse último tem sido usado em muitas aplicações biomédicas, incluindo engenharia de tecidos, devido à sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, não toxicidade e degradação no organismo (MALHOTRA; BASIR, 2020)

A atividade da protease com atividade colagenolítica sofre interferência de vários fatores, como pH e temperatura do meio fermentativo, força iônica, manejo mecânico e operacional. Em contrapartida, as inovações biotecnológicas têm impulsionado o aprimoramento no setor da engenharia industrial, ocorrendo avanços na produção em larga escala e melhorias nos processos industriais.

É nesta ótica que percebemos a importância da busca por novas fontes enzimáticas utilizadas em processos fermentativos. Esta necessidade direciona ao desenvolvimento de estudos envolvendo o conhecimento da produção, caracterização e purificação de proteases com atividade colagenolítica produzidas por espécies de fungos filamentosos. Desta forma, ocorre o aprimoramento acerca da produtividade de enzimas, adequando-se assim à demanda industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Proteases

Proteases, ou peptidases, são enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem de ligações moleculares complexas de proteínas em estruturas mais simples como peptídeos e aminoácidos livres. São responsáveis pela hidrólise completa das proteínas associadas a vias biológicas essenciais. (MASI et al., 2014; RAO et al., 1998).

As proteases classificam-se em endo-peptidases e exo-peptidase, de acordo com sua ação nas ligações peptídicas, agindo nas ligações internas ou clivando ligações peptídicas amino ou carboxi-terminal. As endo-peptidases são subdivididas de acordo com o mecanismo catalítico, em serino-proteases, proteases aspárticas, cisteína proteases, treonina proteases e metalo-proteases (SOUZA et al., 2015; DE CASTRO et al., 2011; YIKE, 2011; DRAG; SALVESEN, 2010; RAO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas possuem diversas aplicações na indústria como detergentes (BAWEJA et al., 2016), amaciamento do couro (RAHMAN et al., 2018), farmacêuticas (ALADDIN et al., 2017), biorremediação (QUINTELLA; MATA; LIMA, 2019), alimentos (TAVANO et al., 2018), fabricação de vinhos (THERON; BELY; DIVOL, 2017), na destilação (KUMAR; DUTT; GAUTAM, 2016), cervejas (JACOB; HUTZLER; METHNER, 2018), atua na síntese de peptídeos e no processamento de proteínas (RAZZAQ et al., 2019) e nas indústrias de rações (SILVA et al., 2018a), atuam melhorando a digestibilidade dos nutrientes alimentares, maximizando o aproveitamento das proteínas e por consequência, diminuindo o valor do custo das formulações. Apesar de ter um vasto uso, a produção destas enzimas ainda não é o suficiente para atender o fluxo crescente do mercado mundial (SUNDARARAJAN; KANNAN; CHITTIBABU, 2011). Entre as enzimas industriais disponíveis no mercado, as proteases são exibidas como uma das enzimas mais versáteis (GURUMALLESH et al., 2019; KUMAR; SINGH, 2014), não apresentando

toxicidade e patogenicidade, que podem ser consideradas como ecologicamente corretas e seguras para todos os setores biotecnológicos (YAZID, 2017).

A aplicação de proteases devido a sua especificidade de substrato em processos industriais apresenta um valor prático e ecológico, pois há uma diminuição dos rejeitos orgânicos com o reaproveitamento destes materiais. Além disso, ao final dos processos, não haverá acúmulo de biomassa ou substâncias químicas no efluente devido à natureza de autólise das proteases que podem se degradar entre si. Assim, nenhum tratamento adicional do efluente é necessário (YAZID; BARRENA; SÁNCHEZ, 2017).

Este tipo de enzima pode ser encontrada a partir de diversas fontes (animal, vegetal e microbiana), pois elas são elementares a qualquer forma de vida neste planeta e fisiologicamente importantes para os organismos vivos. Entretanto, as proteases obtidas através de micro-organismos são as mais almejadas já que elas são viáveis para aplicações biotecnológicas e industriais, onde, através da manipulação genética, pode-se elevar a reprodutibilidade destas enzimas, permitindo assim, um menor tempo de geração da enzima (ABO-ELMAGD; HOUSSEINY, 2012; RAVIKUMAR; DAKSHAYINI; GIRISHA, 2012; RAO; NARASU, 2007;). Essa alteração genética nos micro-organismos produtores de protease visa a geração de novas enzimas com características que são desejáveis para aplicações industriais, possuindo grande capacidade em adaptar-se em ambientes diversos e crescerem em variadas fontes de carbono e nitrogênio, e também possuem grande interação com a superfície área/volume, o que viabiliza absorção de nutrientes para suportar elevadas taxas de metabolismo e biossíntese (DEMAIN, 2000).

As proteases obtidas através de micro-organismos constituem um grupo extenso e complexo de enzimas com propriedades diferentes para substratos específicos, sítio ativo, mecanismo catalítico, temperatura e pH. As enzimas proteolíticas são notadamente importantes porque algumas delas possuem maior estabilidade, são ativas a pH alcalino, em altas temperaturas e na presença de tensoativos, íons metálicos, agentes oxidantes e solventes orgânicos (ANBU, 2013). Essa grande diversidade de proteases, em contraste com a especificidade da sua ação, tem atraído a atenção para exploração de suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas (RAO; NARASU, 2007).

Desta maneira, os micro-organismos constituem uma fonte atraente de proteases visto que podem ser cultivados em larga escala, em um curto período, por meio estabelecido de métodos de fermentação, produzindo uma grande quantidade estável do produto desejado. Ademais, as proteínas microbianas podem ser contidas durante um bom tempo sem perda significativa de atividade enzimática. Geralmente, as proteases decorrentes de micro-organismos são de natureza extracelular e diretamente expelida para o meio fermentativo, diminuindo os processos para purificar a enzima em comparação com as proteases advinda de plantas e animais (SOUZA et al., 2015; KUMARI; SHARMA; JAGANNADHAM, 2012; GUPTA et al., 2002).

As proteases de origem fúngica são empregadas devidas várias razões técnicas, como a possibilidade de obtenção de enzimas numa alta concentração no meio fermentativo e a vantagem sobre as enzimas bacterianas no que diz respeito sobre o processamento downstream, responsável pela separação e purificação da enzima (HAJJI et al., 2010) .

2.1.1 Proteases com atividade colagenolítica

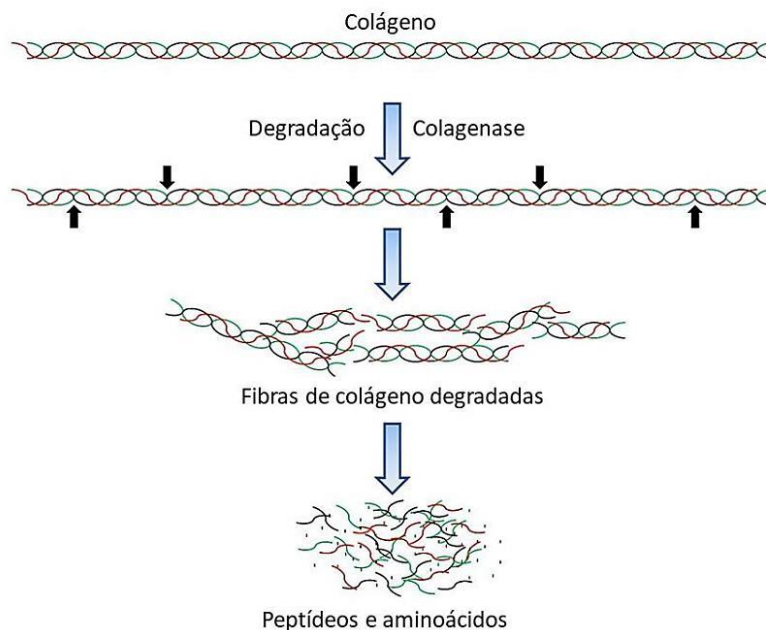
As proteases com atividade colagenolítica tem uma vasta aplicação nas industriais alimentícias, de curtume, têxtil, detergentes, na tenderização de carnes, na terapêutica e biomedicina. Esta enzima age clivando a macromolécula do colágeno em pedaços menores (peptídeos e aminoácidos), disponibilizando-as na corrente sanguínea esquematizada na Figura 1. (BHAGWAT; DANDGE, 2018),

Em geral, as collagenases são classificadas em dois grupos, as metalo-collagenases, ou collagenases verdadeiras, que decompõe a parte helicoidal do colágeno e as serino- collagenases, ou collagenases falsas, que nada mais são enzimas com propriedades colagenolíticas, apresentando assim, a especificidade de decompor a parte não-helicoidal do colágeno (OLIVEIRA et al., 2017a).

As metalo-proteases participam de processos fisiológicos que envolvem reparação tecidual durante a implantação do blastocisto, ovulação, pós-parto e

involução pós-lactação, a reabsorção óssea, cicatrização de feridas. Essa capacidade de processamento também é necessária durante a embriogênese e angiogênese (TALLANT; MARRERO; GOMIS-RÜTH, 2010).

Figura 1: Degradação do colágeno. Fonte: Adaptado de (BHAGWAT; DANDGE, 2018)



A colagenase de fonte animal cliva o colágeno no local específico da tripla hélice do colágeno (PAL; SURESH, 2016). A extração, purificação e caracterização de colagenase de origem animal são frequentemente relatadas. Grande parte dos estudos são em vísceras de peixes (OLIVEIRA et al., 2017b, 2019c; VILLAMIL; VÁQUIRO; SOLANILLA, 2017). Também são relatados de outros animais, como o percevejo *Podisus maculiventris* (GHAMARI et al., 2014) e o caramujo-gigante-africano, *Achatina fulica* (INDRA; RAMALINGAM; BABU, 2005). Há restrição no uso de colagenases animal porque devido ao seu sistema complexo, aumenta subsequentemente o custo da purificação (JHAMPLE; BHAGWAT; DANDGE, 2015).

A maioria das colagenases é relatada tanto de origem animal quanto microbiana. Existem pouquíssimos estudos acerca das colagenases vegetais (RASKOVIC et al., 2014; JHAMPLE; BHAGWAT; DANDGE, 2015).

As proteases, em geral, de fontes microbianas são preferidas devido a sua diversidade bioquímica e possibilidade de manipulação genética (PANDEY et al., 2006; RAO et al., 1998), além disso, as collagenases microbianas têm ampla especificidade de substrato, o que os ajuda a degradar colágenos insolúveis em água e solúveis em água em suas regiões helicoidais triplas (PAL; SURESH, 2016; ADHIKARI; GLASSEY; DUNN, 2012; BAEHAKI et al., 2012).

A fonte comercial de collagenase é *Clostridium histolyticum* (PAL; SURESH, 2016; DABOOR et al., 2010). Todavia, por ser um micro-organismo patogênico, existe a necessidade de alternativas para sua substituição. Outros estudos relataram collagenase produzida por fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Alternaria*. São claramente mais estudados em comparação com leveduras para produção de enzimas collagenolíticas. O gênero *Aspergillus* foi o mais frequente dos três (WANDERLEY et al., 2017), como mostra na Tabela 1.

Tabela 1: Produção de proteases com atividade collagenolítica de fungos do gênero *Aspergillus* cultivados em diferentes tipos de meios fermentativos.

Fungo	Tipo de Fermentação	Atividade Collagenolítica	Referências
<i>A. tamarii</i>	FES	3621 U/gbs	DA SILVA et al., 2018
<i>A. niger</i>	FES	397 U/gbs	BARTHOMEUF; POURRAT; POURRAT, 1992
<i>A. spp</i>	FSm	1345 U/mL	FERREIRA et al., 2017
<i>A. fischeri</i>	FSm	420 U/mL	IDA et al., 2017
<i>A. ochraceus</i>	FSm	59,7 U/mL x 10 ⁻³	OSMOLOVSKIY et al., 2016
<i>A. ustus</i>	FSm	107,2 U/mL x 10 ⁻³	
<i>A. ochraceus</i>	FSm	113,2 U/mL x 10 ⁻³	SHARKOVA et al., 2015
<i>A. ustus</i>	FSm	125,8 U/mL x 10 ⁻³	
<i>A. oryzae</i>	FSm	15,86 U/mL	BALAN et al., 2013
<i>A. ochraceus</i>	FSm	14,56 U/mL	
<i>A. flavus</i>	FSm	1051,75 U/mL	MAHMOUD et al., 2007

Enzimas colagenolíticas produzidas por fungos filamentosos são extremamente vantajosas, por apresentar alta produtividade e baixo custo de produção, além de desenvolvimento rápido e da possibilidade de modificação e recuperação da molécula-alvo (LIMA et al., 2011). Nesse tipo de processo, a produção de enzimas ocorre extracelularmente, facilitando sua recuperação (SANDHYA, 2005). Como as proteases fúngicas são capazes de hidrolisar muitas outras proteínas além do colágeno, a demanda por colagenases de fungos com características adequadas com alta especificidade é muito significativa (SHARKOVA et al., 2015).

Devido à sua atividade distinta, as colagenases microbianas têm enormes aplicações industriais no campo médico, mas também tem imensa importância em vários outros campos, como indústria de alimento, processamento de peixes, fabricação, clareamento e estabilização da cerveja, processamento de carne, cultura de tecidos animais, bem como em outras pesquisas científicas (BHAGWAT et al., 2016; PAL; SURESH, 2016).

2.2. O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* é o mais frequente na produção de enzimas de interesse industrial, sendo o mais estudado pelos pesquisadores, apresentando 41.496 mil artigos de 2010 a 2020 até o presente momento, com destaque para a área de Bioquímica, genética e biologia molecular, alcançando primeiro lugar no ranking com 13.067 mil artigos. Este gênero de fungo é largamente utilizado na produção e aquisição de enzimas e outros compostos industriais, em função do status de muitos fungos filamentosos utilizados serem Geralmente Reconhecido como Seguro – GRAS.

O habitat das espécies deste gênero é versátil, sobrevivendo em diferentes condições climáticas no mundo todo, estando presente no solo, ar, água, em plantas e animais, sendo fundamental na decomposição da matéria orgânica. Além desta função indispensável, o gênero *Aspergillus* é usado para gerenciamento de resíduos e biotransformações (SHARMA et al., 2012).

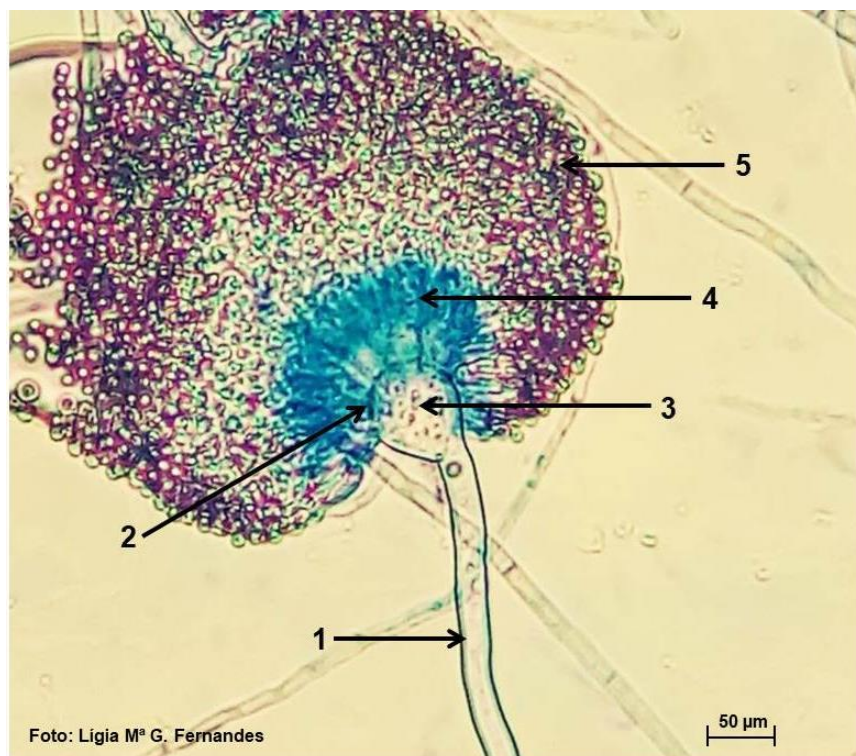
O gênero *Aspergillus* é ubíquo e rico em espécies. Atualmente contém mais de 300 fungos filamentosos. O gênero abrange uma ampla gama de fenótipos e tem importância econômica substancial, pois incluem fermentadores de alimentos, fábricas de células-chave para a produção de enzimas e ácidos orgânicos, organismos modelo para a biologia celular e degradadores de uma gama de biomassa orgânica relevante para a conversão de bioenergia (VESTH et al., 2018).

A colônia de *Aspergillus* é composta por micélio aéreo com conidióforos eretos, densamente difundidos sobre a superfície do meio e com farta produção de conídeos (esporos) (SANTOS, 2007). As espécies deste gênero produzem o *aspergillum*, formada por uma haste asseptada a qual é responsável pelo aparecimento das células conidiogênicas (fiálides e métulas). O *aspergillum* é formado por uma vesícula, com um conjunto de células alongadas (fiálides) de onde surgem os conídeos. Toda a estrutura, constituída pelo *aspergillum*, a haste e a célula pé, configura o conidióforo (Figura 2). É de suma importância a distinção das estruturas morfológicas para classificar e diferenciar as espécies deste grupo.

Dentre os gêneros que compõem os fungos filamentosos, os pertencentes ao *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 intracelulares e extracelulares (GIBBONS; ROKAS, 2013).

As espécies de *Aspergillus* certificam um vasto potencial na produção de proteases. As proteases fúngicas, em processos biotecnológicos, são menos dispendiosas do que proteases bacterianas em técnicas de recuperação e separação enzimática, já que o micélio pode ser extraído na filtração com facilidade (INDRATININGSIH, W., PERTIWININGRUM; SUWARTI, 2013).

Figura 2: *Aspergillus heteromorphus* URM 0269. Conidióforo (1); Métulas (2); Vesícula (3),Fiálides (4), Conídios (5). Aumentado 40X. Fonte: A autora.



2.2.1. *Aspergillus heteromorphus*

O fungo filamentosso *Aspergillus heteromorphus* foi descoberto e catalogado em 1957 por Batista e Maia, descrevendo-o como um tipo de *Aspergillus* contaminante de cultivo laboratorial em Pernambuco, Brasil. Este fungo apresenta micélio aéreo escasso, a cor com tonalidades de marrom a creme, sem odor, conídios piriformes rugosos e exsudato abundante (Figura 3) (BATISTA; MAIA, 1957).

A. heteromorphus está incluso na seção *Nigri* que compreende 26 espécies de fungos filamentosos (VARGA et al., 2011). Espécies dessa seção são produtores prolíficos de proteínas nativas (PAPAGIANNI, 2007; PUNT et al., 2002), ácidos orgânicos (ANDERSEN, 2016; PEL et al., 2007) e metabólitos secundários. Além disso, os membros da seção são geralmente produtores muito eficientes de enzimas extracelulares (MEIJER et al., 2011).

Figura 3: Crescimento radial de *Aspergillus heteromorphus* URM0269 em meio de cultivo batata dextrose ágar (Fonte: a autora)



A literatura acerca de *A. heteromorphus* ainda é escassa, porém com os estudos realizados por Vesth et al., (2018), destacaram que a espécie pode ser relevante com potencial aplicação bioindustrial. Como por exemplo, para biossorção de cromo hexavalente em efluente das indústrias de curtume (SIVAKUMAR, 2016), purificação e caracterização da enzima tanase (CHHOKAR et al., 2010), produção de tanase e ácido gálico (BAWEJA et al., 2016; BENIWAL et al., 2015), produção de celulase termoestável (SINGH et al., 2009) e produção de lacase (SINGH et al., 2010).

Além de trabalhos voltados para interesses em aplicações industriais, as pesquisas de grande importância foram as que analisaram a filogenia e identificação genética dos *Aspergillus* da seção *nigri*, pois existe muita dificuldade de identificar as espécies de *Aspergillus* apenas com a chave de identificação, uma vez que a taxonomia clássica geralmente não é eficiente, sendo necessário o sequenciamento genético e autenticação polifásica (VESTH et al., 2018; HENDRICKX; BUDZIK, J. M., OH, S. Y., SCHNEEWIND, 2011; VARGA et al., 2011).

2.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)

A fermentação em estado sólido (FES) visa o crescimento e a adequação de diferentes tipos de micro-organismos, substratos e parâmetros de processo, tendo recebido considerável atenção nos últimos anos por ser um bioprocessamento bem sucedido. Isto está relacionado com o baixo consumo energético, o meio de cultivo que se assemelha ao ambiente natural dos micro-organismos, menor uso e descarte de água e a utilização de biomassa como substrato (COUTO; SANROMÁN, 2006; KRISHNA, 2005; SINGHANIA et al., 2009).

Existem diferentes tipos de micro-organismos usados no processo de FES, incluindo, fungos, leveduras e bactérias. No entanto, os fungos e leveduras são os mais frequentemente relatados pelo fato de que a FES fornece um habitat natural similar. Os gêneros fúngicos mais relatados em FES são *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhizopus*, que têm uma extensa lista de espécies para a produção de vários bioprodutos (EL-BAKRY et al., 2015). Enquanto os gêneros de leveduras mais comuns são *Saccharomyces*, *Aureobasidium* e *Candida* (LÓPEZ-PÉREZ; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2016). Embora a FES tenda a ser mais favorável para o desenvolvimento de fungos e leveduras, há também bactérias utilizadas na produção de bioprodutos neste tipo de fermentação. Os gêneros de bactérias mais utilizados são *Streptomyces* e *Bacillus* (MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009).

A seleção de substratos adequados também desempenha um papel fundamental em uma produção eficiente e econômica do produto desejado. Na seleção de substratos apropriados para o processo de FES, é importante garantir a disponibilidade e o custo dos substratos. Eles podem fornecer nutrientes apropriados e suporte físico para o desenvolvimento de micro-organismos na FES. Os resíduos orgânicos provenientes do processamento agrícola, industrial e dos resíduos alimentares domésticos são os substratos mais adequados para serem utilizados devido à sua abundância, ao baixo ou nenhum custo, bem como os problemas de poluição ambiental pode ser

minimizado. No entanto, em alguns casos um suplemento adicional deve ser adicionado aos resíduos orgânicos (YAZID, 2017).

Para melhorar a eficiência da FES, deve-se selecionar e aperfeiçoar as variáveis do processo, incluindo, tamanho de partícula, umidade inicial, pH, temperatura, esterilização, concentração de esporos, agitação, aeração e extração de produto (PANDEY, 2003). O tamanho das partículas e a umidade inicial foram os aspectos mais relatados na literatura (DE CASTRO; SATO, 2015; MARTINS et al., 2011; SINGHANIA et al., 2009). É evidente que pequenas partículas de substrato resultariam em aglomeração de substrato que por consequência afetaria a transferência de oxigênio, retardando o desenvolvimento de micro-organismos. Em teoria partículas maiores do substrato fornece melhor aeração, podendo limitar a área de superfície para a fixação microbiana (DE CASTRO; SATO, 2015; PANDEY, 2003). Portanto, estes aspectos precisam ser avaliados criteriosamente. A umidade inicial também tem um papel significativo na FES. O teor ótimo de umidade em um substrato sólido está intimamente relacionado com a difusão correta de nutrientes e oxigênio/dióxido de carbono durante a fermentação. O alto teor de umidade diminui a porosidade, assim, perde a estrutura das partículas e interfere na difusão do oxigênio. Se a umidade for baixa, pode limitar a solubilidade de nutrientes impedindo o desenvolvimento de micro-organismos (YAZID, 2017).

A FES abriu um novo modelo de bioconversão de resíduos sólidos orgânicos, atuando na produção de metabólitos biologicamente ativos, tanto em escala laboratorial quanto em escala industrial. Existem diversos estudos sobre a aplicação da FES na produção de bioprodutos, incluindo enzimas hidrolíticas (EL-BAKRY et al., 2015), biofertilizantes (GAJARDO, 2019), biopesticidas (BALLARDO et al., 2017; CERDA et al., 2019), biossurfactantes (JIMÉNEZ-PEÑALVER et al., 2016), bioetanol (MOLAVERDI et al., 2019), compostos aromáticos (MARTÍNEZ et al., 2017), bioplásticos (CASTILHO; MITCHELL; FREIRE, 2009), pigmentos (RING et al., 2018) e antibióticos (NAGAVALLI et al., 2015).

Visando a tecnologia verde e o desenvolvimento sustentável, a produção de enzimas tem estado em alta na bioindústria por substituir processos

químicos que interfere direta ou indiretamente em humanos e no meio ambiente. Nos últimos anos, a produção de enzimas da FES ganhou destaque devido à sua simplicidade, alta produtividade e estabilidade que os tornam adequados para processos industriais. Várias revisões sobre a produção de enzimas da FES foram publicadas nas últimas décadas (EL-BAKRY et al., 2015; PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SINGHANIA et al., 2009; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). A configuração para a produção de enzimas em FES é bastante simples e econômica, já que a abundância de resíduos orgânicos pode ser usada como substrato para a produção, além de reduzir o consumo de produtos químicos, energia e água.

Os benefícios da FES estão relacionados com a produção de extratos concentrados, o emprego de biomassas como substratos, baixo consumo energético, uso reduzido de água e condições de cultivo que simulam o ambiente natural dos micro-organismos, fungos em particular (COUTO; SANROMÁN, 2006; KRISHNA, 2005; SINGHANIA et al., 2009). De fato, o processo requer baixo consumo de energia, uma vez que a agitação e a esterilização nem sempre são necessárias. Da mesma forma, esse processo reduz os custos de purificação devido à maior concentração do produto final ou ao uso do produto em uma forma bruta (LÓPEZ-PÉREZ; VINIEGRA-GONZÁLEZ, 2016).

Apesar desses benefícios, a FES também arca com desafios, como controle operacional, transferência de massa e calor, aumento de escala, bem como, estimativa e recuperação de biomassa (HONGZHANG; HONGQIANG; LIYING, 2011). A heterogeneidade do substrato relacionada à porosidade pode levar a problemas de massa e transferência de calor em FES. O leito do substrato dentro da FES, é um meio complexo composto por uma combinação de fases sólida, líquida e gasosa que requer uma porosidade ideal para o processo de transferência de massa e calor. Um substrato compacto resulta na redução da porosidade que leva a uma má transferência de oxigênio, ficando propenso a contaminação, enquanto que em condições adversas inibe o crescimento microbiano e limita a transferência de nutrientes (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

A tendência em usar a FES em vários processos biotecnológicos e na produção de bioprodutos de interesse comercial parece muito atraente e promissor, pois além de contribuir para uma boa gestão de resíduos sólidos orgânicos, minimizando a poluição ambiental, ainda diminui os custos de produção e operação. Com o aprimoramento da teoria e a ampliação da tecnologia para a produção de biomoléculas, a FES pode ser considerada uma técnica eficiente para a valorização de resíduos sólidos orgânicos.

2.3.1. Fermentação em estado sólido com *Aspergillus*

Diversos micro-organismos podem se desenvolver nos substratos sólidos, como fungos, leveduras e bactérias, porém os fungos filamentosos se sobressaem, afinal, crescem com pouca oferta de água e em diversos tipos sólidos, inclusive a sua forma de crescimento favorece a disseminação no meio em virtude da formação de hifas (DURAND, 2003).

Há uma tendência na utilização de fungos filamentosos em FES, escolhidos principalmente por sua capacidade de produzir enzimas termoestáveis de alto valor comercial (ÁVILA-CISNEROS et al., 2014; LIU et al., 2011; MARTINS et al., 2011; SAQIB et al., 2012; SINGH; SINGH; BISHNOI, 2009), como mostra na Tabela 2.

As proteases produzidas por micro-organismos das espécies de *Aspergillus*, em particular, têm sido estudadas com detalhes, uma vez que são conhecidos por sua capacidade de excretar níveis elevados de enzima em seu ambiente de crescimento (SOUZA et al., 2015). Quando estas enzimas são utilizadas na FES, são produzidas a partir de vários resíduos agroindustriais e também de curtume, especialmente utilizando fungos do gênero *Aspergillus* (SETHI et al., 2016).

Após a produção das proteases (*upstream*) é necessária uma segunda etapa referente à recuperação e a pré-purificação dessas biomoléculas (*downstream*) para serem utilizadas em suas aplicações (YEGIN et al., 2011). Uma das técnicas que vem sendo empregadas é a purificação parcial usando o particionamento bifásico

Tabela 2. Proteases produzidas por *Aspergillus* a partir de resíduos orgânicos utilizados como substrato na fermentação em estado sólido.

Micro-organismos	Substratos	Referências
<i>A. oryzae</i>	Farelo de semente de algodão e casca de laranja	(DE CASTRO; SATO, 2014)
<i>A. oryzae</i>	Resíduo de Ginkgo Biloba	(ZHOU et al., 2014)
<i>A. oryzae</i>	Farelo de arroz/ farelo de trigo	(ASHWINI, S.; RAGHAVENDRA, 2019)
<i>A. oryzae</i>	Farelo de trigo	(SANDHYA et al., 2005)
<i>A. oryzae</i>	Resíduo de café	(MURTHY; NAIDU, 2010)
<i>A. oryzae</i>	Torta de Canola	(FREITAS et al., 2013)
<i>A. oryzae</i>	Farelo de arroz	(CHUTMANOP et al., 2008)
<i>A. oryzae</i>	Farelo de soja	(THAKUR; NEMADE; A, 2015)
<i>A. niger</i>	Pena de frango	(DE OLIVEIRA; DE SOUZA; DE CASTRO, 2019)
<i>A. niger</i>	Cascos de soja com cascas de laranja	(LÓPEZ et al., 2018)
<i>A. niger</i>	Torta de mahua e mamona	(GUPTA et al., 2018)
<i>A. awamori</i>	Farelo de pão	(MELIKOGLU; LIN; WEBB, 2013, 2015)
<i>A. awamori</i>	Torta de babaçu	(DE CASTRO; CASTILHO; FREIRE, 2014; DE CASTRO et al., 2011)
<i>A. fumigatus</i>	Farelo de trigo	(DA SILVA et al., 2013)
<i>A. tamarii</i>	Farelo de trigo	(DA SILVA et al., 2017, 2018)
<i>A. tubingensis</i>	Resíduos de colza e farelo de trigo	(GUILLAUME et al., 2019)
<i>A. hennebergi</i>	Farelo de trigo	(HUANG; WANG; XU, 2017)
<i>A. parasiticus</i>	Farelo de trigo	(CADIRCI et al., 2015)
<i>A. awamori, A. sojae, A. flavipes, A. kawachii, A. japonicus, A. oryzae, A. giganteus, A. terreus, A. rhizopodus</i>	Farelo de trigo	(ORTIZ et al., 2016)
<i>A. flavipes, A. niger, A. brasiliensis, A. oryzae,</i>	Farelo de trigo e farelo de soja	(NOVELLI; BARROS; FLEURI, 2016)

2.4. Sistema de duas fases aquosas – SDFA

Em 1896, Beijerinck, acidentalmente, deu origem ao campo do sistema de duas fases aquosas (SDFA) quando misturou uma solução aquosa de amido com uma solução aquosa de gelatina e percebeu que não eram miscíveis (VAN BERLO; LUYBEN; VAN DER WIELEN, 1998). No entanto, como em muitos outros eventos importantes na ciência, demorou décadas até encontrar uma aplicabilidade para este sistema. Até que Per-Åke Albertsson, redescobriu o SDFA ao tentar purificar cloroplastos (ALBERTSSON, 1985). Desde então, esse sistema inovador de purificação de biomoléculas tem sido usado para diversos propósitos (GRILO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016).

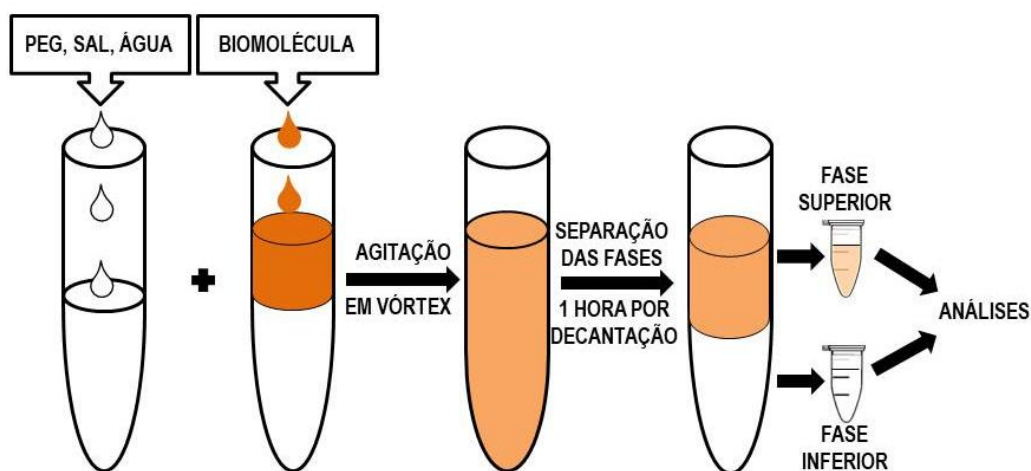
A extração líquido-líquido utilizando sistemas de duas fases aquosas é uma técnica alternativa de separação e purificação de proteínas, organelas, células, vírus, entre outras. Apresentam condições experimentais compatíveis com a natureza das biomoléculas. Essa técnica pode ser utilizada nas etapas iniciais de um processo simples e econômico em substituição de técnicas mais complexas de separação sólido-líquido (ASENJO; ANDREWS, 2012; PÉREZ et al., 2015).

Os componentes do sistema quando se separam favorecem o particionamento do produto biológico para uma das fases e, através de ensaios laboratoriais e estatísticos, é possível definir os parâmetros que levam a uma separação ideal. Com isso, a simplicidade da técnica faz do SDFA um processo atrativo e de fácil reprodução em larga escala para extrair enzimas de interesse comercial (TANG et al., 2014).

Os bioprodutos purificados através de SDFA incluem proteínas (KHAN; CHEONG; LIU, 2018; VICENTE et al., 2019), enzimas (DA SILVA; ALVES; PORTO, 2018; SILVA; DE FRANÇA; PORTO, 2018), células (GONZÁLEZ-GONZÁLEZ; RITO-PALOMARES, 2014; ZIMMERMANN et al., 2018), anticorpos (AZEVEDO et al., 2009; ROGERS et al., 2019), antibióticos (SANT'ANNA et al., 2016; TORRES-ACOSTA et al., 2018), dentre outros. Uma vantagem significativa do SDFA é a simplicidade do equipamento necessário (RAJA et al., 2012).

Esse sistema, exemplificado na Figura 4, é constituído de dois polímeros hidrofílicos (geralmente polietilenoglicol (PEG) e dextrana ou um polímero e um sal (por exemplo, fosfato, sulfato ou citrato) e constituem um meio propício para extração de biomoléculas, pois preservam a estabilidade molecular das mesmas por apresentar alto teor de água em ambas as fases (ALI et al., 2014).

Figura 4: Esquema do sistema de duas fases aquosas (SDFa) PEG/Sal.
Fonte: A autora.



Outros tipos incluem líquidos iônicos e álcoois de cadeia curta. Os sistemas formados por polímero-polímero e polímero-sal são estudados há mais de cinco décadas, sendo que os sistemas polímero-polímero são preferencialmente utilizados para solutos de separação, recuperação e purificação sensíveis ao ambiente iônico, pois esses sistemas apresentam baixa força iônica. Enquanto, a alta força iônica é a única desvantagem do sistema de sais poliméricos (IQBAL et al., 2016).

A maioria dos SDFAs são otimizadas de acordo com as propriedades físico-químicas dos solutos das biomoléculas. Diferentes artigos de revisão (GRILLO; AIRES-BARROS; AZEVEDO, 2016; IQBAL et al., 2016) e livros (KILIKIAN; PESSOA JR, 2020; ALBERTSSON, 1985; FISHER, 2012; WALTER; JOHANSSON, 1994) discutem detalhadamente estes fatores. Os principais fatores que influenciam o comportamento da partição das biomoléculas no sistema são:

- **Massa molar (MM) e concentração do polímero**

Como a maioria dos SDFAs é composta de polímero - polímero/sal, a massa molar do polímero influencia bastante a partição da molécula.

Em um sistema de polímero - sal, a partição para a fase polímero, diminui com o aumento da concentração de polímero em um sistema polímero – polímero, a partição diminui para a fase com polímero de alta massa molar. A principal razão é o aumento do deslocamento da biomolécula dessa fase ou as alterações na hidrofobicidade das fases. À medida que aumenta a MM do polímero aumenta também a hidrofobicidade, reduzindo os grupos hidrofílicos (ASENJO; ANDREWS, 2011).

- **Hidrofobicidade**

A hidrofobicidade exerce um papel importante na partição de biomoléculas. As baixas concentrações de sal não afetam o SDFa, no entanto, altas concentrações de sal alteram o diagrama de fases. A adição de sal no sistema tem um efeito significativo no coeficiente de partição, pois esses sais contêm íons de diferentes hidrofobicidade e os íons hidrofóbicos forçam a partição da molécula para a fase com maior hidrofobicidade e vice-versa (IQBAL et al., 2016).

- **pH**

O pH do SDFa pode alterar as propriedades de carga do soluto, o que afeta a partição da biomolécula. A carga líquida da proteína se torna negativa em caso de pH mais alto que o ponto isoelétrico e positiva em caso de pH menor que o ponto isoelétrico. Se o pH for igual ao ponto isoelétrico, a carga líquida será zero. Foi relatado que a partição da biomolécula com carga negativa em um sistema de pH alcalino aumenta o coeficiente de partição e a biomolécula alvo tende a se direcionar para a fase superior. Valores de pH mais altos que o ponto isoelétrico da biomolécula induzem uma afinidade para a fase rica em PEG devido ao momento dipolar positivo (ASENJO; ANDREWS, 2011).

- **Temperatura**

A temperatura tem grande influência na composição do SDFa, inclusive no diagrama de fases. As alterações de temperatura também afetam a partição através da viscosidade e densidade. Deve-se ter um controle rigoroso das temperaturas durante os experimentos relacionados ao SDFa. Em geral, a separação de fases é obtida a uma temperatura mais baixa em um sistema polímero - polímero com menores concentrações de polímero; no entanto, um efeito oposto é observado no sistema polímero – sal (WALTER; JOHANSSON, 1994). O comportamento de particionamento da biomolécula e a taxa de separação de fases também são influenciados pelas propriedades físico-químicas (ou seja, densidade, viscosidade e tensão interfacial) do SDFa. A medição de tais propriedades foi explicada por (ALBERTSSON, 1985; ZASLAVSKY, 1994).

O grande desafio da biotecnologia consiste em aplicar a enzima em diferentes setores da indústria sem que para isso necessite recorrer a métodos de custos elevados. Apesar dos micro-organismos serem fontes inesgotáveis de diversas enzimas, o processo de extração de moléculas de interesse se torna dispendioso em virtude dos processos empregados para separar a molécula alvo de moléculas contaminantes. Os métodos convencionais para purificar biomoléculas geralmente incluem etapas muito complexas. Uma alternativa viável é extrair a molécula de interesse em sistema bifásico aquoso (LIMA et al., 2013).

2.5 Imobilização enzimática

O processo de imobilização enzimática tem sido estudado desde 1960 (MENDES et al., 2011), e na base de dados Scopus é possível encontrar 52.916 artigos utilizando os termos “immobilization” e “enzyme”, sendo encontrados mais de 2.500 artigos por ano. Sendo assim, este assunto vem atraindo pesquisas nas mais diferentes áreas, destacando a área de Bioquímica, genética e biologia molecular.

A imobilização de uma enzima significa combinar as características, estabilidade e cinética dessa enzima com as propriedades físicas e químicas do suporte em uma formulação especializada que tem como papel principal maximizar a estabilidade física e enzimática do biocatalisador (BASSO; SERBAN, 2019). Alguns fatores que influenciam a imobilização enzimática estão esquematizado na Figura 5.

Figura 5: Fatores que influenciam a imobilização enzimática. (Fonte: a autora)

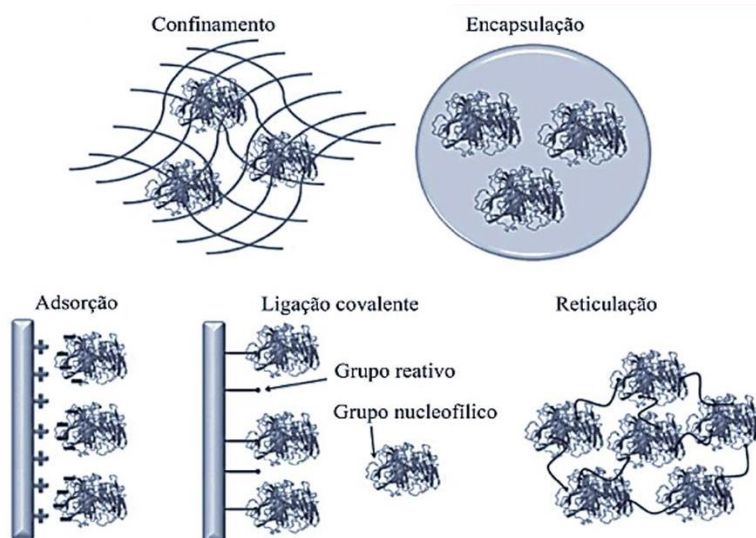


Algumas propriedades e fatores contribuem para escolha de um bom suporte:

- Área superficial: Maior área superficial do suporte leva a uma maior carga enzimática na matriz de suporte.
- Porosidade: O tamanho do poro do suporte deve fornecer acesso enzimático à estrutura interna do suporte, permitindo a difusão, melhorando assim o processo de transferência de massa e melhorando o rendimento da imobilização.
- Estabilidade: O suporte deve exibir estabilidade química e térmica e insolubilidade sob condições de reação.
- Grupos funcionais de superfície: A imobilização enzimática em um suporte é aprimorada pela presença de grupos funcionais favoráveis na superfície, o que garante forte integração da enzima e pouca lixiviação.

A técnica de imobilizar consiste em confinar a enzima em suportes de forma física ou por reações químicas em condições apropriadas. Existem muitos métodos diferentes usados para imobilização enzimática, mas a indústria sempre prefere métodos simples e econômicos. Os métodos mais utilizados são baseados na imobilização física (adsorção ou aprisionamento físico) e imobilização química (ligação covalente e reticulação). A Figura 6 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos comumente utilizados para imobilização de enzimas.

Figura 6: Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação. (SOUZA et al., 2017)



Cada um desses métodos tem suas próprias vantagens e desvantagens e nenhum método é ideal para todas as situações de imobilização. Por exemplo, a adsorção física tem como vantagem de ser um método simples, reversível, com pouca alteração enzimática e reutilizável, porém a força da ligação é fraca entre a enzima e o suporte facilitando a dessorção com mudanças de pH, temperatura e força iônica. A imobilização por ligação covalente confere maior resistência enzimática quanto variação de pH, temperatura e solventes orgânicos. A desvantagem é que na maioria dos casos, ocorre a redução da atividade enzimática quando há alteração em sua conformação ou no suporte. A técnica de reticulação tem a vantagem de a atividade enzimática ser altamente concentrada e estável, mas requer cristalização da enzima antes da reticulação, que é um processo oneroso. Por

fim temos o processo de imobilização por encapsulação ou aprisionamento. Esta técnica protege a enzima do meio reacional, diminuindo os efeitos de inativação, como solventes, variações de pH e temperatura. Também não sofre alteração estrutural da molécula além de ser um método simples e de baixo custo. A desvantagem nesse processo é que pode ocorrer a dessorção da enzima devido aos diferentes tamanhos de poros do suporte. Todas essas desvantagens podem ser minimizadas com planejamento adequado a cada experimento.

Em alguns processos, dois ou mais métodos podem ser combinados para aumentar a eficiência do processo, atividade e estabilidade enzimática. Portanto, as condições ótimas de imobilização para uma enzima específica, são determinadas através de processos laboratoriais, a fim de se obter maior fixação da atividade enzimática, a viabilidade do reuso e estabilidade operacional (SOUZA et al., 2017).

Em processos industriais, a contribuição de custo de uma enzima imobilizada depende da cinética e especificidade da reação, mas também do número de ciclos em que a enzima é reutilizada como medida indireta da produtividade total em kg de produto por kg de biocatalisador (DI COSIMO et al., 2013).

Existem várias técnicas e suportes para obter a imobilização enzimática. O material de suporte pode ter um efeito crucial na estabilidade da enzima e na eficiência deste processo. É difícil prever com antecedência qual suporte será mais adequado. No entanto, em geral, este suporte ou transportador enzimático, deve ter algumas propriedades como resistência física à compressão e ataque microbiano, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, estéril e ter baixo custo.

Devido à natureza proteica das enzimas, quando comparadas com outros catalizadores orgânicos e inorgânicos, são moléculas mais frágeis e apresentam alto custo e grande instabilidade em muitas condições reacionais. O emprego de técnicas de imobilização é uma excelente forma de estabilizá-las e torná-las reutilizáveis. Portanto, as propriedades enzimáticas, como estabilidade, reutilização e atividade, devem ser melhoradas antes da sua implementação em escala industrial, para tornar um processo economicamente

viável (TERCAN, 2011). As enzimas imobilizadas fornecem benefícios substanciais aos processos industriais em que são usadas atualmente. Alguns dos benefícios são: simplificação de processos, impacto ambiental reduzido e um processo mais sustentável em comparação com a síntese química (SHELDON; VAN PELT, 2013). Como resultado desses fatores, a imobilização é uma das ferramentas mais importante para melhorar as propriedades enzimáticas e reduzir o custo operacional. O uso de uma enzima imobilizada permite simplificar o processo contínuo e o controle da reação (SOUZA et al., 2017).

2.5.1 Imobilização enzimática em Alginato de Cálcio

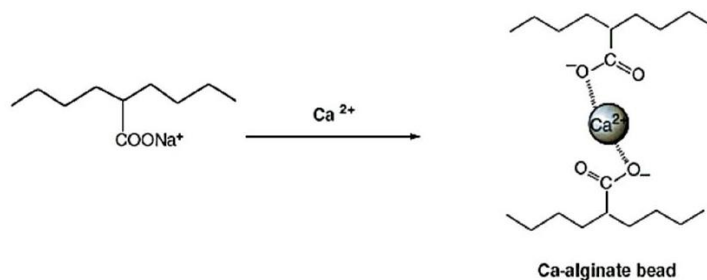
É de suma importância o papel do suporte no processo de imobilização, pois estabiliza a enzima para usos sucessivos sem perda de atividade. Qualquer material a ser usado como imobilização deve facilitar interações estáveis entre o suporte e a enzima para que ocorra uma imobilização eficaz sem perturbar a estrutura enzimática e seu local ativo. Deve ser estável, inerte, econômico e evitar qualquer contaminação (PANDEY; DAVEREY; ARUNACHALAM, 2020). A estrutura do alginato e as propriedades físico-químicas associadas desempenham um papel vital na interação com a enzima durante o processo de imobilização.

O alginato é um polissacarídeo de origem natural muito versátil com diversos usos devido à sua funcionalidade biotecnológica. É largamente utilizado nas indústrias têxtil, alimentícia e farmacêutica, e suas aplicações têm aumentado por causa da sua baixa toxicidade, hidrofiliabilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, baixo custo e gelificação suave através da adição de cátions bivalentes como o íon Ca^{2+} , estes são preferidos principalmente por causa de suas propriedades atóxicas (GOK; AYTAS, 2009; PETZOLD et al., 2019).

Cada íon Ca^{2+} da solução de CaCl_2 é substituído pelos íons Na^{2+} do alginato de sódio, ligando-se a dois grupos carboxila de moléculas de alginato adjacentes induzindo a formação de gel, resultando assim na formação de

esferas de alginato de Cálcio como observado na Figura 7 (KUMAR; CHANDRASEKARAN, 2003).

Figura 7. Mecanismo básico para a formação de esferas de alginato de cálcio (Fonte: TERCAN, 2011).



Numerosos outros cátions, incluindo Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} induzirão a gelificação, mas por causa da sua toxicidade, raramente são usados. Devido ao alto teor de água das contas de alginato, que é de cerca de 95%, o microambiente do alginato é geralmente inerte às drogas e células proteicas (TERCAN, 2011). Este polissacarídeo aniônico pode ser facilmente modificado por meio de reações químicas e físicas para criar hidrogéis, esferas, microesferas, microcápsulas, esponjas, espumas e fibras. As suas características mencionadas anteriormente, aliada a alta resistência mecânica das matrizes, as tornam úteis no encapsulamento de células e enzimas, no reparo da cartilagem, na cicatrização de feridas, na administração controlada de medicamentos e na regeneração óssea (PETZOLD et al., 2019; POPA; REIS; GOMES, 2015).

Diversos tipos de enzimas são utilizadas no processo de imobilização em alginato com múltiplas aplicações biotecnológicas, mostrando ser um suporte promissor para esta técnica em processos industriais como observado na Tabela 3. O aprisionamento da enzima em alginato de cálcio é reconhecido como um método rápido, não tóxico, barato e versátil para imobilização de enzimas. O uso de alginato como agente imobilizante na maioria das aplicações reside em sua capacidade de formar géis fortes estáveis ao calor que podem se desenvolver e se ajustar à temperatura ambiente.

Tabela 3: Imobilização de enzimas em alginato com seus respectivos rendimentos e aplicações industriais

Origem da enzima	Enzima	Y (%)	Aplicabilidade industrial	Referências
<i>Bacillus subtilis</i>	Protease	45	Produção de proteína hidrolisada, maturação de queijos, tenderização e cura de carnes, indústria de	(ANWAR et al., 2009)
Sigma	Protease	30,7	detergentes, clarificação de cerveja, indústria de curtume	(GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2017)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Pectinase	59,71	Fermentação do cacau, extração de óleos, clarificação e extração de	(DE OLIVEIRA et al., 2018)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Pectinase	80	sucos, maceração de polpas, degomagem de fibras nas indústrias têxtil e de papel	(REHMAN et al., 2013)
Sigma	Pectinase,	83,4		(GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2017)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Polygalacturonase	95	Processamento de sucos; tratamento de resíduos vegetais e extração de óleos	(SILVA et al., 2018b)
<i>Aspergillus aculeatus</i>	Frutossiltransferase	22,24	Hidrolisa a molécula de sacarose produzindo frutooligossacarídeos	(OLIVEIRA; SILVA; PORTO, 2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Celulase	60	Liquefaz o tecido vegetal e permite extrair pigmentos do fruto	(ANDRIANI et al., 2012)
Sigma	α-amylase	83,8	Formação da maltose	(GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2017)
<i>Bacillus circulans</i>	Amilase	75	Converte o amido em dextrose ou xaropes ricos em açúcares simples	(DEY; SINGH; BANERJEE, 2003)
Malte de milho	Amilase	100		(SILVA et al., 2008)
<i>Aspergillus niger</i>	Glicoamilase	95	Decompõe o amido, evitando turvação e gelatinização durante o processamento	(ROY; GUPTA, 2004)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Amiloglucosidase	66	Indústria alimentícia e de papel	(PERVEZ; AMAN; UL QADER, 2017)
<i>Sacchaomycesce revisiae</i>	Invertase	76	Inversão da sacarose	(MALHOTRA; BASIR, 2020)
<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	Pullulanase	96	Sacarificação do amido	ROY; GUPTA, 2004)
Novozymes	Laccase	88,12	biorremediação de solos e efluentes, produção de bioetanol e biossensores.	(LU; ZHAO; WANG, 2007)

*Y (%): Rendimento da atividade da enzima imobilizada

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Produzir e extrair protease colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 e imobilizá-la em esferas de alginato.

3.2. Objetivo específico

- Produzir proteases com atividade colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 utilizando fermentação em estado sólido (FES);
- Avaliar a influência de variáveis na produção da protease com atividade colagenolítica utilizando planejamento fatorial 2^2 ;
- Extrair a protease colagenolítica através/usando em Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFa) utilizando planejamento fatorial 2^4 ;
- Imobilizar a protease colagenolítica em alginato, utilizando planejamento fatorial 2^2 ;
- Definir os parâmetros bioquímicos da protease colagenolítica obtida das etapas de fermentação, imobilização e particionamento.

4. REFERÊNCIAS

ABO-ELMAGD, H. I.; HOUSSEINY, M. M. Purification and characterization of carboxymethyl cellulase and protease by *Ulocladium botrytis* Preuss ATCC 18042 using water hyacinth as a substrate under solid state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1547–1556, 2012.

ADHIKARI, A. S.; GLASSEY, E.; DUNN, A. R. Conformational dynamics accompanying the proteolytic degradation of trimeric collagen I by collagenases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 32, p. 13259–13265, 2012.

ALADDIN, A. et al. Biotechnological Aspects and Pharmaceutical Applications of Bacterial Proteases Biotechnological Aspects and Pharmaceutical Applications of. **Der Pharmacia Lettre**, v. 9, p. 9–20, 2017.

ALBERTSSON, P.-Å. History of aqueous polymer two-phase partition. In Partitioning in Aqueous Two-Phase System: Theory, Methods, Uses, and Applications to Biotechnology. Orlando: Academic Press, 1985.

ALI, S. M. et al. Recovery and partial purification of fibrinolytic enzymes of *Auricularia polytricha* (Mont.) Sacc by an aqueous two-phase system. **Separation and purification Technology**, v. 122, p. 359–366, 2014.

ANBU, P. Characterization of solvent stable extracellular protease from *Bacillus koreensis* (BK-P21A). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 56, p. 162–168, 2013.

ANDERSEN, M. R. Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. **Genome research**, v. 21, n. 6, p. 885–897, 2016.

ANDRIANI, D. et al. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 29–33, 2012.

ANWAR, A. et al. Calcium alginate : a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281–1286, 2009.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: A perspective. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 49, p. 8826–8835, 2011.

ASENJO, J. A.; ANDREWS, B. A. Aqueous two-phase systems for protein separation: Phase separation and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1238, p. 1–10, 2012.

ASHWINI, S.; RAGHAVENDRA, M. P. Production of High Yield Amylase and Protease by *Aspergillus oryzae* using Solid-State Fermentation. **Research & Reviews: A Journal of Microbiology and Virology**, v. 8, n. 3, p. 71–79, 2019.

ÁVILA-CISNEROS, N. et al. Production of Thermostable Lipase by *Thermomyces lanuginosus* on Solid-State Fermentation: Selective Hydrolysis of Sardine Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 174, n. 5, p. 1859–1872, 2014.

AZEVEDO, A. M. et al. Partitioning of human antibodies in polyethylene glycol-sodium citrate aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 65, n. 1, p. 14–21, 2009.

BAEHAKI, A. et al. Purification and characterization of collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 10, p. 2373–2379, 2012.

BALAN, D. et al. Novel Fungal Collagenase from *Aspergillus oryzae*. **Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies**, v. 17, p. 160–163, 2013.

BALLARDO, C. et al. A novel strategy for producing compost with enhanced biopesticide properties through solid-state fermentation of biowaste and inoculation with *Bacillus thuringiensis*. **Waste Management**, v. 70, p. 53–58, 2017.

BARTHOMEUF, C.; POURRAT, H.; POURRAT, A. Collagenolytic activity of a new semi-alkaline protease from *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 233–236, 1992.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes — A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

BATISTA, A. C.; MAIA, H. DA S. Alguns *Aspergillus* contaminantes de culturas. **An Soc Biol Pernamb**, v. 15, p. 181–237, 1957.

BAWEJA, M. et al. An alkaline protease from *Bacillus pumilus* MP 27: Functional analysis of its binding model toward its applications as detergent additive. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–14, 2016.

BENIWAL, V. et al. Use of chickpea (*Cicer arietinum L.*) milling agrowaste for the production of tannase using co-cultures of *Aspergillus awamori* MTCC 9299 and *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1277–1286, 2015.

BHAGWAT, P. K. et al. Purification, properties and application of a collagenolytic protease produced by: *Pseudomonas sp.* SUK. **RSC Advances**, v. 6, n. 69, p. 65222–65231, 2016.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43–55, 2018.

ZASLAVSKY, B. Y. **Aqueous two-phase partitioning: physical chemistry and bioanalytical applications**. CRC press, 1994.

CADIRCI, B. H. et al. A Thermostable Serine Protease By *Aspergillus parasiticus* TEM Have Promising Activity In Enzymatic Dehairing Process. **Journal of new results in science**, v. 8, p. 72–83, 2015.

CASTILHO, L. R.; MITCHELL, D. A.; FREIRE, D. M. G. Production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from waste materials and by-products by submerged and solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 23, p. 5996–6009, 2009.

CERDA, A. et al. Valorisation of digestate from biowaste through solid-state fermentation to obtain value added bioproducts: A first approach. **Bioresource Technology**, v. 271, p. 409–416, 2019.

CHHOKAR, V. et al. Purification and characterization of extracellular tannin acyl hydrolase from *Aspergillus heteromorphus* MTCC 8818. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 5, p. 793–799, 2010.

CHUTMANOP, J. et al. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates Jarun. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 329–333, 2008.

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. Á. Application of solid-state fermentation to food industry: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291–302, 2006.

DA SILVA, O. S. et al. Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 168–173, 2017.

DA SILVA, O. S. et al. Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamarii* URM4634. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1081–1088, 2018.

DA SILVA, O. S.; ALVES, R. O.; PORTO, T. S. PEG-sodium citrate aqueous two-phase systems to in situ recovery of protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 by extractive fermentation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, p. 209–216, 2018.

DA SILVA, R. R. et al. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 235–243, 2013.

DABOOR, S. M. et al. Extraction and purification of collagenase enzymes: A critical review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 239–263, 2010.

DE CASTRO, A. M.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate Optimization and Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 3, p. 1588–1602, 2014.

DE CASTRO, A. M. H. et al. Multiresponse optimization of inoculum conditions for the production of amylases and proteases by *Aspergillus awamori* in solid-state fermentation of babassu cake. **Enzyme Research**, v. 2011, 2011.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20–25, 2014.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Enzyme Production by Solid State Fermentation: General Aspects and an Analysis of the Physicochemical Characteristics of Substrates for Agro-industrial Wastes Valorization. **Waste and Biomass Valorization**, v. 6, n. 6, p. 1085–1093, 2015.

DE OLIVEIRA, C. C.; DE SOUZA, A. K. S.; DE CASTRO, R. J. S. Bioconversion of Chicken Feather Meal by *Aspergillus niger*: Simultaneous Enzymes Production Using a Cost-Effective Feedstock Under Solid State Fermentation. **Indian Journal of Microbiology**, 2019.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Thermodynamic and kinetic studies on pectinase extracted from *Aspergillus aculeatus*: Free and immobilized enzyme entrapped in alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, n. 2017, p. 1088–1093, 2018.

DEMAIN, A. L. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. **Biotechnology Advances**, v. 18, n. 6, p. 499–514, 2000.

DEY, G.; SINGH, B.; BANERJEE, R. Immobilization of α -Amylase Produced by *Bacillus circulans* GRS 313. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 2, p. 167–176, 2003.

DI COSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437–6474, 2013.

DRAĞ, M.; SALVESEN, G. S. NIH Public Access Emerging principles in protease-based drug discovery Marcin. v. 9, n. 9, p. 690–701, 2010.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 113–125, 2003.

EL-BAKRY, M. et al. From wastes to high value added products: Novel aspects of SSF in the production of enzymes. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 18, p. 1999–2042, 2015.

FERREIRA, C. M. O. et al. Collagenase produced from *Aspergillus sp.* (UCP 1276) using chicken feather industrial residue. **Biomedical Chromatography**, v. 31, n. 5, 2017.

FISHER, D. **Separations using aqueous phase systems: applications in cell biology and biotechnology**. Berlin: Springer Science & Business Media. 2012

FREITAS, A. C. et al. Canola Cake as a Potential Substrate for Proteolytic Enzymes Production by a Selected Strain of *Aspergillus oryzae*: Selection of Process Conditions and Product Characterization . **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

GAJARDO, A. E. R. et al. **Process for producing a biofertilizer comprising the steps of solid - state fermentation, immobilization through allophane nanoparticles and a second fermentation; and the said biofertilizer**. Depositante: Anali Estela Rosas Gajardo. US10173938B2. Depósito: 8 de janeiro de 2019.

GHAMARI, M. et al. Biochemical characterisation of the tissue degrading enzyme, collagenase, in the spined soldier bug, *Podisus maculiventris* (Hemiptera: Pentatomidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 54, n. 2, p. 164–170, 2014.

GIBBONS, J. G.; ROKAS, A. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 1, p. 14–22, 2013.

GOK, C.; AYTAS, S. Biosorption of uranium(VI) from aqueous solution using calcium alginate beads. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 1, p. 369–375, 2009.

GONZÁLEZ-GONZÁLEZ, M.; RITO-PALOMARES, M. Aqueous two-phase systems strategies to establish novel bioprocesses for stem cells recovery. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, n. 4, p. 318–327, 2014.

GRILO, A. L.; AIRES-BARROS, M. R.; AZEVEDO, A. M. Partitioning in Aqueous Two-Phase Systems: Fundamentals, Applications and Trends. **Separation and Purification Reviews**, v. 45, n. 1, p. 68–80, 2016.

GUILLAUME, A. et al. Contribution of proteases and cellulases produced by solid-state fermentation to the improvement of corn ethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, 2019.

GUPTA, A. et al. Fermentation of Non-Edible Oil Seed Cakes for Production of Proteases and Cellulases and Degradation of Anti-Nutritional Factors Abstract. **Journal of food biotechnology research**, v. 2, p. 1–6, 2018.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–395, 2002.

GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 1–15, 2017.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

HAJJI, M. et al. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Periploca laevigata* root barks. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 724–731, 2010.

HENDRICKX, A. P.; BUDZIK, J. M.; OH, S. Y.; SCHNEEWIND, O. Architects at the bacterial surface—sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 3, p. 166, 2011.

HONGZHANG, C.; HONGQIANG, L.; LIYING, L. The inhomogeneity of corn stover and its effects on bioconversion. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 5, p. 1940–1945, 2011.

HUANG, Y.; WANG, Y.; XU, Y. Purification and characterisation of an acid protease from the *Aspergillus hennebergii* HX08 and its potential in traditional fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 3, p. 432–441, 2017.

IDA, É. L. et al. Biochemical properties and evaluation of washing performance in commercial detergent compatibility of two collagenolytic serine peptidases secreted by *Aspergillus fischeri* and *Penicillium citrinum*. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 47, n. 3, p. 282–290, 2017.

INDRA, D.; RAMALINGAM, K.; BABU, M. Isolation, purification and characterization of collagenase from hepatopancreas of the land snail *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 142, n. 1, p. 1–7, 2005.

INDRATININGSIH, W., PERTIWININGRUM, A.; SUWARTI, S. A. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristic and the effect of temperature on the protease activity. **International Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 298–301, 2013.

IQBAL, M. et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–18, 2016.

JACOB, F. F.; HUTZLER, M.; METHNER, F. J. Comparison of various industrially applicable disruption methods to produce yeast extract using spent yeast from top-fermenting beer production: influence on amino acid and protein content. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 1, p. 95–109, 2018.

JHAMPLE, S. B.; BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Statistical media optimization for enhanced production of fibrinolytic enzyme from newly isolated *Proteus penneri* SP-20. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 370–379, 2015.

JIMÉNEZ-PEÑALVER, P. et al. Production of sophorolipids from winterization oil cake by solid-state fermentation: Optimization, monitoring and effect of mixing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 115, p. 93–100, 2016.

KHAN, B. M.; CHEONG, K.-L.; LIU, Y. Aqueous two-phase system: “Aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 8398, p. 1–14, 2018.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos. Operações e processos com aplicação industrial**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2020.

KRISHNA, C. Solid-state fermentation systems - An overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, n. 1–2, p. 1–30, 2005.

KUMAR; SINGH, D. Global scenario of industrial enzyme market Complimentary Contributor Copy. **Industrial Enzymes**, v. 10, p. 173–196, 2014.

KUMAR, A. et al. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n. 10, p. 1205–1237, 2007.

KUMAR, A.; DUTT, D.; GAUTAM, A. Production of crude enzyme from *Aspergillus nidulans* AKB-25 using black gram residue as the substrate and its industrial applications. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 107–118, 2016.

KUMAR, S. R.; CHANDRASEKARAN, M. Continuous production of L-glutaminase by an immobilized marine *Pseudomonas sp* BTMS-51 in a packed bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 10, p. 1431–1436, 2003.

KUMARI, M.; SHARMA, A.; JAGANNADHAM, M. V. Religiosin B, a milk-clotting serine protease from *Ficus religiosa*. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1295–1303, 2012.

LIMA, C. A. et al. Production and characterization of a collagenolytic serine proteinase by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A factorial study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, n. 3, p. 549–560, 2011.

LIMA, C. A. et al. Two-phase partitioning and partial characterization of a collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622: Application to collagen hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 64–71, 2013.

LIU, D. et al. Thermostable cellulase production of *Aspergillus fumigatus* Z5 under solid-state fermentation and its application in degradation of agricultural wastes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 717–725, 2011.

LÓPEZ-PÉREZ, M.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Production of protein and metabolites by yeast grown in solid state fermentation: Present status and perspectives. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1224–1231, 2016.

LÓPEZ, D. N. et al. Peptidase from *Aspergillus niger* NRRL 3: Optimization of its production by solid-state fermentation, purification and characterization. **LWT**, v. 98, p. 485–491, dez. 2018.

LU, L.; ZHAO, M.; WANG, Y. Immobilization of laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 159–166, 2007.

MAHMOUD, Y. A. G. et al. Characterisation and inhibition effect of cetrimide on collagenase produced by *Aspergillus flavus*, isolated from mycotic ulcers. **Annals of Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 109–113, 2007.

MALHOTRA, I.; BASIR, S. F. Immobilization of invertase in calcium alginate and calcium alginate-kappa-carrageenan beads and its application in bioethanol production. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 494–503, 2020.

MARTÍNEZ, O. et al. Valorization of sugarcane bagasse and sugar beet molasses using *Kluyveromyces marxianus* for producing value-added aroma compounds via solid-state fermentation. **Journal of Cleaner Production**, v. 158, p. 8–17, 2017.

MARTINS, S. et al. Bioactive phenolic compounds: Production and extraction by solid-state fermentation. A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 365–373, 2011.

MASI, C. et al. Production and process optimization of protease using various bacterial species – A review. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 9, p. 4268–4275, 2014.

MEIJER, M. et al. Growth and hydrolase profiles can be used as characteristics to distinguish *Aspergillus niger* and other black *aspergilli*. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 19–30, 2011.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Stepwise optimisation of enzyme production in solid state fermentation of waste bread pieces. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 638–646, 2013.

MELIKOGLU, M.; LIN, C. S. K.; WEBB, C. Solid state fermentation of waste bread pieces by *Aspergillus awamori*: Analysing the effects of airflow rate on enzyme production in packed bed bioreactors. **Food and Bioproducts Processing**, v. 95, p. 63–75, 2015.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MOLAVERDI, M. et al. High titer ethanol production from rice straw via solid-state simultaneous saccharification and fermentation by *Mucor indicus* at low enzyme loading. **Energy Conversion and Management**, v. 182, p. 520–529, 2019.

MURADO, M. A.; GONZÁLEZ, M. D. P.; VÁZQUEZ, J. A. Recovery of proteolytic and collagenolytic activities from viscera by-products of rayfish (*Raja clavata*). **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p. 803–815, 2009.

MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Protease Production by *Aspergillus oryzae* in Solid-State Fermentation Utilizing Coffee By-Products. **World Applied Sciences Journal**, v. 8, n. 2, p. 199–205, 2010.

NAGAVALLI, M. et al. Solid State Fermentation and production of Rifamycin SV using *Amycolatopsis mediterranei*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 44–51, 2015.

NINGTHOUJAM, D. S. et al. Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 7, p. 907–916, 2009.

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

OLIVEIRA, R. L. DE; SILVA, M. F. DA; PORTO, T. S. Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por aprisionamento em alginato e ágar-ágar. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 17–21, 2017.

OLIVEIRA, V. DE M. et al. Fish collagenases and its industrial applications.

Pubvet, v. 11, n. 3, p. 243–255, 2017a.

OLIVEIRA, V. DE M. et al. Collagenase de pescada branca: Extração, purificação parcial, caracterização e teste de especificidade ao colágeno para aplicação industrial. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 1, p. 52–64, 2017b.

OLIVEIRA, V. DE M. et al. Recovery of fibrinolytic and collagenolytic enzymes from fish and shrimp byproducts: Potential source for biomedical applications. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 45, n. 1, p. 1–10, 2019c.

ORTIZ, G. E. et al. A Comparative Study of New *Aspergillus* Strains for Proteolytic Enzymes Production by Solid State Fermentation. **Enzyme Research**, v. 2016, 2016.

OSMOLOVSKIY, A. A. et al. Fibrinolytic and collagenolytic activity of extracellular proteinases of the strains of micromycetes *Aspergillus ochraceus* L-1 and *Aspergillus ustus* 1. **Moscow University Biological Sciences Bulletin**, v. 71, n. 1, p. 62–66, 2016.

PAL, G. K.; SURESH, P. V. Microbial collagenases: Challenges and prospect in production and potential applications in food and nutrition. **RSC Advances**, v. 6, n. 40, p. 33763–33780, 2016.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81–84, 2003.

PANDEY, A. et al. **Enzyme Technology**. Springer Science & Business Media, 2006.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153–1169, 2000.

PANDEY, D.; DAVEREY, A.; ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, 2020.

PAPAGIANNI, M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 244–263, 2007.

PARK, P. J. et al. Purification and characterization of a collagenase from the mackerel, *Scomber japonicus*. **Journal of Biochemistry and Molecular**

Biology, v. 35, n. 6, p. 576–582, 2002.

PEL, H. J. et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 221–231, 2007.

PÉREZ, R. L. et al. Optimization of pancreatic trypsin extraction in PEG/citrate aqueous two-phase systems. **Protein Expression and Purification**, v. 106, p. 66–71, 2015.

PERVEZ, S.; AMAN, A.; UL QADER, S. A. Role of two polysaccharide matrices on activity, stability and recycling efficiency of immobilized fungal amyloglucosidase of GH15 family. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 70–77, 2017.

PETZOLD, G. et al. Alginate as a versatile polymer matrix with biomedical and food applications. **Materials for Biomedical Engineering**, p. 323–350, 2019.

POPA, E. G.; REIS, R. L.; GOMES, M. E. Seaweed polysaccharide-based hydrogels used for the regeneration of articular cartilage. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 410–424, 2015.

PUNT, P. J. et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. **Trends in biotechnology**, v. 20, n. 5, p. 200–206, 2002.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M. T.; LIMA, L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of Environmental Management**, v. 241, p. 156–166, 2019.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 127–135, 2003.

RAHMAN, M. S. et al. Screening of protease producing bacteria from tannery wastes of leather processing industries at Hazaribag, Bangladesh. **Jahangirnagar University Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 1, p. 23–34, 2018.

RAJA, S. et al. Aqueous Two Phase Systems for the Recovery of Biomolecules – A Review. **Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2012.

RAO, K.; NARASU, M. L. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 21, p. 2493–2496, 2007.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RASKOVIC, B. et al. Identification, purification and characterization of a novel collagenolytic serine protease from fig (*Ficus carica* var. Brown Turkey) latex. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 6, p. 622–627, 2014.

RAVIKUMAR, K.; DAKSHAYINI, J.; GIRISHA, S. T. Biodiesel Production from Oleaginous Fungi. **International Journal of Life Sciences**, v. 6, n. 1, p. 43–49, 2012.

RAZZAQ, A. et al. Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–20, 2019.

REHMAN, H. U. et al. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1081–1086, 2013.

RESEARCH AND MARKETS. Refinery catalysts market nears \$7.2 bn by 2025 - analysis on key innovators, the market leaders, and emerging players. **Focus on Catalysts**, p. 2, 2019.

RING, L. C. et al. Chemical Optimization of Red Pigment, Monascorubin Production in *Penicillium minioluteum* ED24 Using Solid-State Fermentation. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 43, n. 7, p. 3485–3491, 2018.

ROGERS, B. A. et al. A stepwise mechanism for aqueous two-phase system formation in concentrated antibody solutions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 32, p. 15784–15791, 2019.

ROY, I.; GUPTA, M. N. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 1, p. 26–32, 2004.

SALOMÃO, E. DE A. **Purificação e caracterização bioquímica das amilases produzidas por *Aspergillus sp.* e *Neurospora crassa* exo-1: imobilização da enzima em alginato de sódio**. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

SANDHYA, C. et al. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2689–2694, 2005.

SANT'ANNA, V. et al. Liquid–liquid extraction of antimicrobial peptide P34 by aqueous two-phase and micellar systems. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 46, n. 8, p. 838–843, 2016.

SANTOS, S. F. DE M. **Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato**. 2007.

SAQIB, A. A. N. et al. A thermostable crude endoglucanase produced by *Aspergillus fumigatus* in a novel solid state fermentation process using isolated free water. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.

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**, v. 10, n. 4, p. 571–583, 2016.

SHARKOVA, T. S. et al. Screening of Producers of Proteinases with Fibrinolytic and Collagenolytic Activities among Micromycetes. **Mikrobiologija**, v. 84, n. 3, p. 316–322, 2015.

SHARMA, N. et al. A biodegradation study of forest biomass by *Aspergillus niger* F 7: Correlation between enzymatic activity, hydrolytic percentage and biodegradation index. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 467–475, 2012.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Research review paper Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SILVA, E. P. DA et al. Seleção de fungos do gênero *Aspergillus* produtores de tanase para inclusão em ração animal. **Pubvet**, v. 12, n. 2, p. 1–7, 2018a.

SILVA, J. DE C. et al. Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate-immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, v. 74, p. 61–70, 2018b.

SILVA, J. DE C.; DE FRANÇA, P. R. L.; PORTO, T. S. Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate. **Journal of Molecular Liquids**, v. 263, n. 2017, p. 81–88, 2018.

SILVA, R. L. D. F. O. B. E. et al. Imobilização de enzimas de milho maltado em gel. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 642–648, 2008.

SINGH, A. et al. Laccase production by *Aspergillus heteromorphus* using distillery spent wash and lignocellulosic biomass. **Journal of Hazardous Materials**, v. 176, n. 1–3, p. 1079–1082, 2010.

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Production of Cellulases by *Aspergillus Heteromorphus* from Wheat Straw under Submerged Fermentation. **International Journal of Civil and Environmental Engineering**, v. 1, n. 1, p. 23-26, 2009.

SINGH, R. et al. Optimization of synergistic parameters for thermostable cellulase activity of *Aspergillus heteromorphus* using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 1, p. 28–35, 2009.

SINGHANIA, R. R. et al. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 13–18, 2009.

SIVAKUMAR, D. Biosorption of hexavalent chromium in a tannery industry wastewater using fungi species. **Global Journal of Environmental Science and Management**, v. 2, n. 2, p. 105–124, 2016.

SOUZA, P. M. et al. Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17–21, 2015.

SOUZA, L. T. A. et al. "Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte", p. 529 -568. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

SUMANTHA, A. et al. Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 5, p. 843–851, 2006.

SUNDARARAJAN, S.; KANNAN, C. N.; CHITTIBABU, S. Alkaline protease from *Bacillus cereus* VITSN04: Potential application as a dehairing agent. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 128–133, 2011.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS-RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 20–28, 2010.

TANG, M. S. Y. et al. Separation of single-walled carbon nanotubes using aqueous two-phase system. **Separation and Purification Technology**, v. 125, p. 136–141, 2014.

TAVANO, O. L. et al. Biotechnological applications of proteases in food technology. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 2, p. 412–436, 2018.

TERCAN, Ç. **Immobilization of thermophilic recombinant esterase enzyme by microencapsulation in alginate-chitosan/CaCl₂ polyelectrolyte beads**. 2011.

THAKUR, S.; NEMADE, S. N.; A, S. Solid State Fermentation of Overheated Soybean Meal (Waste) For Production of Protease Using *Aspergillus Oryzae*. **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology**, v. 4, n. 1, p. 18456–18461, 2015.

THERON, L. W.; BELY, M.; DIVOL, B. Characterisation of the enzymatic properties of MpAPr1, an aspartic protease secreted by the wine yeast *Metschnikowia pulcherrima*. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 97, p. 3584–3593, 2017.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TORRES-ACOSTA, M. A. et al. Economic evaluation of the primary recovery of tetracycline with traditional and novel aqueous two-phase systems. **Separation and Purification Technology**, v. 203, p. 178–184, 2018.

VAN BERLO, M.; LUYBEN, K. C. A. M.; VAN DER WIELEN, L. A. M. Poly(ethylene glycol)-salt aqueous two-phase systems with easily recyclable volatile salts. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 711, n. 1–2, p. 61–68, 1998.

VARGA, J. et al. New and revisited species in *Aspergillus* section Nigri. **Studies in Mycology**, v. 69, p. 1–17, 2011.

VESTH, T. C. et al. Investigation of inter- and intraspecies variation through genome sequencing of *Aspergillus* section Nigri. **Nature Genetics**, v. 50, n. 12, p. 1688–1695, 2018.

VICENTE, F. A. et al. Integration of aqueous (micellar) two-phase systems on the proteins separation. **BMC Chemical Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 2019.

VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. **Food Chemistry**, v. 224, p. 160–171, 2017.

WALTER, H.; JOHANSSON, G. **Aqueous Two-Phase Systems**. v. 228. Berlim: Elsevier, 1994.

WANDERLEY, M. C. DE A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

YAZID, N. A. Proteases from protein-rich waste: Production by SSF, downstream, immobilisation onto nanoparticles and application on protein hydrolysis. 2017.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. The immobilisation of proteases produced by SSF onto functionalized magnetic nanoparticles: Application in the hydrolysis of different protein sources. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 230–242, 2017.

YEGIN, S. et al. Aspartic proteinases from *Mucor spp.* in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949–960, 2011.

YIKE, I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299–323, 2011.

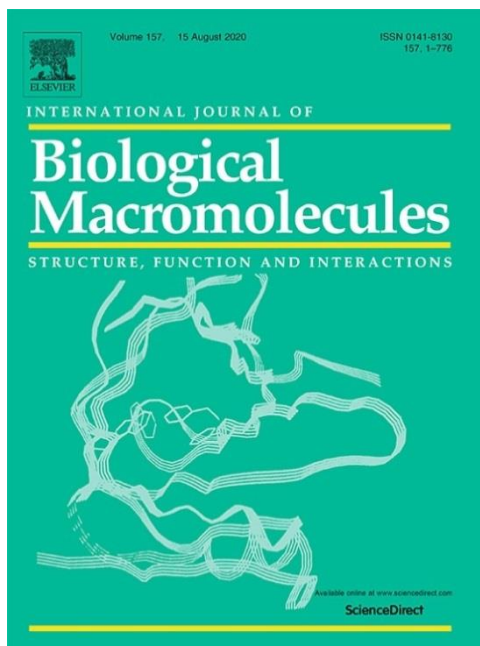
ZHOU, H. et al. Solid-state fermentation of *Ginkgo biloba L.* residue for optimal production of cellulase, protease and the simultaneous detoxification of *Ginkgo biloba L.* residue using *Candida tropicalis* and *Aspergillus oryzae*. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 2, p. 379–388, 2014.

ZIMMERMANN, S. et al. Cell separation in aqueous two-phase systems— influence of polymer molecular weight and tie-line length on the resolution of five model cell lines. **Biotechnology journal**, v. 13, n. 2, p. 1700250, 2018.

CAPÍTULO I:**Imobilização de protease colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 em alginato de cálcio**

Lígia Maria Gonçalves Fernandes, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Ana
Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Este artigo será submetido à revista:

International Journal of Biological Macromolecules

ISSN: 0141-8130

Cite Score: 6.9 Impact Factor: 5.162

**Imobilização de protease colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus*
URM 0269 em alginato de cálcio**

Lígia Maria Gonçalves Fernandes¹, Márcia Nieves Carneiro da Cunha¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Tatiana Souza Porto^{*2}

¹ Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, S/N, Recife, PE, Brasil.

² Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901, Garanhuns, PE, Brasil.

*Autor correspondente

Tatiana Souza Porto

Tel: (81) 9987876831

E-mail: portots@gmail.com

Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns, Garanhuns, PE 55292-270, Brasil.

RESUMO

A busca por fontes alternativas de enzimas que visem garantir a estabilidade enzimática e a reutilização desses biocatalizadores assumem fundamental importância no campo da biotecnologia devido a grande demanda industrial por essas biomoléculas. Diante disto, este trabalho objetivou imobilizar e caracterizar proteases colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 em alginato de cálcio. Foram obtidos altos rendimentos de imobilização (82,82% e de 94,58% para as atividades proteolíticas e colagenolítica, respectivamente). A enzima imobilizada obteve estabilidade de armazenamento com apenas 36,82% de perda de atividade após o sétimo dia e mais de 40% de rendimento na atividade proteolítica no 3º ciclo de uso. Também apresentou maior estabilidade nas variações de pH e temperatura quando comparada com a enzima livre. Esses resultados mostraram o potencial da protease colagenolítica produzida por *A. heteromorphus* URM 0269 e imobilizada em alginato de cálcio, podendo ser explorada em vários setores da indústria biotecnológica.

Palavras-chave: Protease colagenolítica, *Aspergillus heteromorphus*, Imobilização, Alginato de cálcio.

ABSTRACT

The search for alternative sources of enzymes that aim to ensure enzymatic stability and the reuse of these biocatalysts is of fundamental importance in the field of biotechnology due to the great industrial demand for these biomolecules. In view of this, this work aimed to immobilize and characterize collagenolytic proteases of *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in calcium alginate. High immobilization yields were obtained (82.82% and 94.58% for proteolytic and collagenolytic activities, respectively). The immobilized enzyme obtained storage stability with only 36.82% loss of activity after the seventh day and more than 40% yield in proteolytic activity in the 3rd cycle of use. It also showed greater stability in pH and temperature variations when compared to the free enzyme. These results showed the potential of the collagenolytic protease produced by *A. heteromorphus* URM 0269 and immobilized in calcium alginate, which can be explored in several sectors of the biotechnology industry.

Keyword: Collagenolytic protease, *Aspergillus heteromorphus*, Immobilization, Calcium alginate

1. INTRODUÇÃO

O mercado biotecnológico tem se esforçado em seu avanço para acompanhar a demanda global por enzimas, principalmente da classe das proteases, uma vez que muitos dos bioprocessos requerem este tipo de biomolécula aplicada em uma ou mais etapas industriais. Proteases como tripsina, quimotripsina, pepsina e colagenase são atualmente as mais requisitadas, seja devido sua utilização nos segmentos alimentício, têxtil, farmacêutico, nutracêutico, biomédico, ração animal; seja pela necessidade de renovação de suas fontes de fornecimento (BASSO; SERBAN, 2019; GURUMALLESH et al., 2019; KUMAR; SINGH, 2014).

Proteases colagenolíticas são enzimas capazes de clivar a tripla hélice do colágeno, sendo por isso, almejadas principalmente em tratamento de feridas, doenças crônicas, cirurgias e cicatrizações. Atualmente, a indústria faz uso desse grupo de proteases a partir de fontes bacterianas, todavia, o alto custo de produção tem inviabilizado essa prática. Em contrapartida, as proteases colagenolíticas de origem fúngica são uma alternativa viável para atender a demanda do mercado (BHAGWAT; DANDGE, 2018)

Dentre as fontes fúngica, o gênero *Aspergillus* vem recebendo atenção especial, devido a sua capacidade em produzir uma grande variedade de enzimas de interesse industrial, além da facilidade de cultivo e de manuseio em etapas de separação e purificação (WANDERLEY et al., 2017)

O uso de enzimas em aplicações industriais é frequentemente dificultado pela falta de estabilidade operacional a longo prazo e por ser difícil recuperar e reutilizar as mesmas (DE OLIVEIRA et al., 2018;). Estas desvantagens podem ser superadas com diferentes medidas para reduzir o custo e aumentar sua utilização, como o uso da técnica de imobilização. As enzimas imobilizadas são amplamente utilizadas em diferentes indústrias, especialmente em alimentos e em produtos farmacêuticos, por oferecerem várias vantagens em relação às enzimas livres (ROMERO-FERNÁNDEZ; PARADISI, 2020; SHELDON; VAN PELT, 2013). As enzimas podem ser imobilizadas usando uma variedade de suportes naturais e sintéticos. A escolha do suporte e/ou técnica depende da natureza da enzima, seu substrato e sua aplicação (ANDRIANI et al., 2012; ROMERO-FERNÁNDEZ; PARADISI, 2020). O aprisionamento no alginato de

cálcio é reconhecido como um método rápido, não tóxico, barato e versátil para imobilização de enzimas e células (SOUZA et al., 2017)

Deste modo, este trabalho objetivou imobilizar proteases com atividade colagenolítica a partir de *Aspergillus heteromorphus* URM0269 em esferas de alginato de cálcio e definir suas as condições bioquímicas ótimas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. *Micro-organismos*

O fungo filamentososo, *Aspergillus heteromorphus* URM 0269, foi obtido da coleção de culturas URM, do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brasil. O micro-organismo foi mantido em meio BDA (Batata Dextrose Agar) a 30°C por 7 dias para induzir a esporulação. Os esporos foram coletados após adição de 5 mL de NaCl a 0,9% (p/v) e solução de Tween 80 a 0,01% (v/v) previamente esterilizada a 121°C por 20 min.

2.2. Produção de protease colagenolítica

A fermentação em estado sólido foi realizada em frascos Erlenmeyer de 150 mL contendo 3g de farelo de trigo como substrato por 96 h a 30°C. O substrato apresentou umidade de 20% composta por inóculo 10^6 esporos/mL e solução nutritiva (0,5% de extrato de levedura e 1% de glucose). O extrato enzimático foi obtido pela adição de 7,5 mL de solução de fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) por grama de material fermentado e homogeneizado em agitador por 1 h. Posteriormente, o material foi macerado, filtrado à vácuo e centrifugado para a obtenção do extrato enzimático e posterior determinação das atividades enzimáticas.

2.3 *Imobilização enzimática em esferas de alginato*

A imobilização de protease colagenolítica em esferas de alginato foi realizada de acordo com Bickerstaff (1997), com modificações. A solução

enzimática e a solução de alginato de sódio foram misturadas (1:1) e adicionadas por gotejamento em solução de cloreto de cálcio (1:10) em agitação contínua, levando à formação de esferas de alginato de cálcio. As enzimas imobilizadas foram mantidas em solução de CaCl_2 por 20 minutos e lavadas com água deionizada e armazenadas em tampão Tris-HCl 1mM (pH 7,5) a 4°C para posterior análise. Os experimentos de imobilização da protease colagenolítica foram realizados de acordo com planejamento fatorial 2^2 , com quatro pontos centrais. As variáveis analisadas foram: concentrações de alginato de sódio (2,0, 3,0 e 4,0%) e de cloreto de cálcio (0,2; 0,4 e 0,6 M). O rendimento da imobilização foi tomado como resposta do planejamento dos experimentos, sendo expresso pela seguinte equação (1):

$$Y(\%) = \frac{\text{Atividade da enzima imobilizada}}{\text{Atividade da enzima livre}} \times 100 \quad (1)$$

2.4 Estabilidade de armazenamento e reutilização da enzima imobilizada

A estabilidade de armazenamento da protease imobilizada foi calculada determinando a atividade enzimática ao longo de 7 dias. A reutilização da enzima imobilizada está relacionada à sua estabilidade operacional e foi determinada pela realização de 6 ciclos repetidos de atividade enzimática.

2.5 Determinações Analíticas

2.5.1 Determinação da atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada de acordo com Leigton *et al.* (1973), com modificações. Resumidamente, 0,15 mL de extrato enzimático foram misturados com 0,25 mL de solução de azocaseína (10 mg/mL p/v de caseína impregnada com corante Azo dissolvida em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4) por 60 min. a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% (p/v). As amostras foram centrifugadas a 8000 rpm (Z326K - HERMLE Labortechnik GmbH) por 15 min, a 4°C. Em seguida, foram adicionados 0,8 mL do sobrenadante a 1,4 mL de NaOH 1,0 M.

Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima capaz de levar a um aumento de 0,1 na absorvância a λ 420 nm em 1 h.

2.5.2 Determinação da atividade colagenolítica

A atividade colagenolítica foi realizada usando como substrato o colágeno impregnado com corante azo (Azocoll) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) de acordo com o método de Chavira *et al.* (1984), com adaptações. Resumidamente, 5 mg de Azocoll foram misturados com 50 μ L de extrato enzimático e 950 μ L de tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 7,4) por 3 horas a 37°C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 8000 rpm a 4°C por 10 min. A absorvância foi medida no espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec 7000 - GE Healthcare Bio-Sciences AB) a λ 520 nm. Uma unidade colagenolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de levar a um aumento de 0,1 na absorvância a λ 520 nm em 3 horas. A atividade específica foi calculada como a razão entre a atividade enzimática e o conteúdo total de proteínas da amostra, expresso em U/mg.

2.6 Parâmetros bioquímicos

2.6.1 Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada

A atividade proteolítica foi determinada em triplicata com soluções de azocaseína a 10 mg/mL preparadas em diferentes tampões a 0,2 M: fosfato/citrato (pH 5,0-7,0), Tris-HCl (pH 7,0 -9,0) e glicina-NaOH (pH 9,0-12,0) a 25°C durante 60 min. Essa atividade foi então expressa como porcentagem de atividade relativa em comparação com o valor máximo e os resultados foram expressos como média e desvio padrão. A estabilidade da protease foi determinada incubando-se as amostras contendo enzima nos tampões acima sem azocaseína, avaliando a atividade da enzima no período de 24 h e expressando como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial.

2.6.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade térmica

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi investigado entre 20 e 80°C usando uma solução de azocaseína a 10 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,5). A atividade relativa foi calculada em porcentagem com base na maior atividade inicial da enzima. A estabilidade enzimática foi determinada incubando-a no tampão acima sem azocaseína, avaliando a atividade da enzima no período de 180h e expressando-a como porcentagem de atividade residual em comparação com o valor inicial. Todas as experiências foram realizadas em triplicatas, e os resultados expressos em média e desvio padrão.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito da concentração de CaCl_2 e alginato de sódio na imobilização da protease colagenolítica

As propriedades gelificantes do alginato são baseadas em interações com íons multivalentes. Entre os diferentes íons, o Ca^{2+} possui a maior afinidade pela solução de alginato e tem baixa toxicidade. A ligação iônica formada para esse íon e os grupos carboxilas de alginato de sódio leva à formação de gel mecanicamente estáveis de alginato (RINAUDO, 2008). Devido a esse mecanismo, foram estudados os efeitos das concentrações de CaCl_2 e alginato de sódio na imobilização da protease colagenolítica.

A Tabela 1 apresenta a matriz experimental e os resultados obtidos para a imobilização da protease colagenolítica produzida por *A. heteromorphus* URM 0269 utilizando a técnica de aprisionamento em esferas de alginato de cálcio. Os melhores rendimentos foram obtidos no ensaio 4 composto pelos maiores níveis das variáveis independentes utilizadas (Alginato de sódio 4%; CaCl_2 0,6 M) nesta condição os rendimentos foram de 82,82 e 94,58% para a atividade proteolítica e colagenolítica, respectivamente. Resultado similar foi obtido por De Oliveira; Silva e Porto (2017) para a imobilização da enzima frutossiltransferase utilizando a mesma técnica. Tais autores avaliaram a influência de diferentes concentrações de alginato de sódio e CaCl_2 e obtiveram o maior rendimento de imobilização enzimática (22,24%) nas

maiores concentrações testadas 4,5 % de alginato de sódio: e a 0,6 M de CaCl_2 .

Tabela 1. Resultados do planejamento fatorial 2^2 para imobilização de protease colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM0269 em esferas de alginato.

Ensaio	CaCl_2 (M)	Alginato (%)	Rendimento em Atividade proteásica (%)	Rendimento em Atividade colagenolítica (%)
1	0,2	2	52,88	71,49
2	0,6	2	71,91	80,35
3	0,2	4	54,13	74,37
4	0,6	4	82,82	94,58
5	0,4	3	36,22	65,71
6	0,4	3	37,48	61,63
7	0,4	3	36,35	65,60
8	0,4	3	36,22	62,77

A análise estatística dos resultados revelou que a maioria dos efeitos de variáveis independentes, ou seja, concentração de alginato de sódio (%) e concentração de CaCl_2 , bem como suas interações foram estatisticamente significativas a um nível de confiança de 95% (Tabela 2), apresentando efeito positivo, o que indicou que o aumento das concentrações de CaCl_2 e alginato de sódio poderia aumentar o rendimento de imobilização da enzima. Segundo Rehman (2013) um aumento na concentração de CaCl_2 pode diminuir o rendimento da imobilização. Assim como altas concentrações de alginato de sódio, diminuem o tamanho dos poros da esfera, limitando o contato entre a enzima e o substrato. No entanto nas concentrações avaliadas não foi observado esse comportamento. Sugere-se que no presente trabalho maiores concentrações de CaCl_2 promoveram uma rápida gelificação, o que propiciou uma maior retenção enzimática nas esferas, e quando combinado com uma maior concentração de alginato de sódio resultou em esferas mais resistentes. A diminuição dos poros provocada pela maior concentração de alginato de sódio utilizada foi favorável, pois possivelmente diminuiu a lixiviação da enzima

nas etapas de lavagem, entretanto não impedindo sua interação com o substrato. Portanto, determinar as concentrações adequadas de alginato de sódio e cloreto de cálcio é fundamental para maximizar o rendimento da imobilização.

Tabela 2. Efeito estatístico calculado para as variáveis respostas do planejamento fatorial 2^2 para imobilização da protease colagenolítica de *Aspergillus heteromorphus* URM 0269.

Variáveis	Rendimento em Atividade Proteolítica (%)	Rendimento em Atividade Colagenolítica (%)
(1) Concentração de CaCl_2 (M)	39,17*	7,09*
(2) Concentração de Alginato (%)	9,98*	4,17*
1 x 2	7,92*	2,76

3.5. Reutilização e estabilidade de armazenamento da enzima imobilizada

Ao comparar o desempenho de biocatalisadores imobilizados destinados ao uso industrial, o conhecimento de sua estabilidade operacional é muito importante. A estabilidade de uma enzima imobilizada sem perda significativa da atividade da enzima é importante principalmente para a viabilidade financeira de um bioprocessos. A atividade imobilizada da protease colagenolítica foi avaliada usando um processo repetitivo de ciclos para observar a reutilização desta enzima que diminuiu gradualmente durante 6 ciclos de reutilização.

No terceiro ciclo, a enzima mostrou mais de 40% de rendimento na atividade enzimática. Após o sexto ciclo, a atividade restante foi inferior a 10% (Figura 1) Essa diminuição pode ser causada pelo vazamento da enzima das esferas junto com o processo e as etapas de lavagem no final de cada ciclo (MESQUITA et al., 2018).

A estabilidade do armazenamento é um dos parâmetros mais importantes a serem considerados na imobilização enzimática, pois confere o uso deste complexo por um maior período de tempo sem grande perda

enzimática (PETZOLD et al., 2019). A protease colagenolítica imobilizada mostrou apenas 36,82% de perda de atividade após o sétimo dia.

Resultados similares foram obtidos no rendimento da atividade enzimática na imobilização e na estabilidade de armazenamento de protease por *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS, onde no terceiro ciclo obteve 35% de rendimento e 89% de perda da atividade no décimo dia de armazenamento (ANWAR et al., 2009). Na imobilização de celulase por *B. subtilis* TD6 usando o mesmo suporte, os autores obtiveram 45% de rendimento de atividade no terceiro ciclo e 45% de perda de atividade após 6 dias de armazenamento (ANDRIANI et al., 2012).

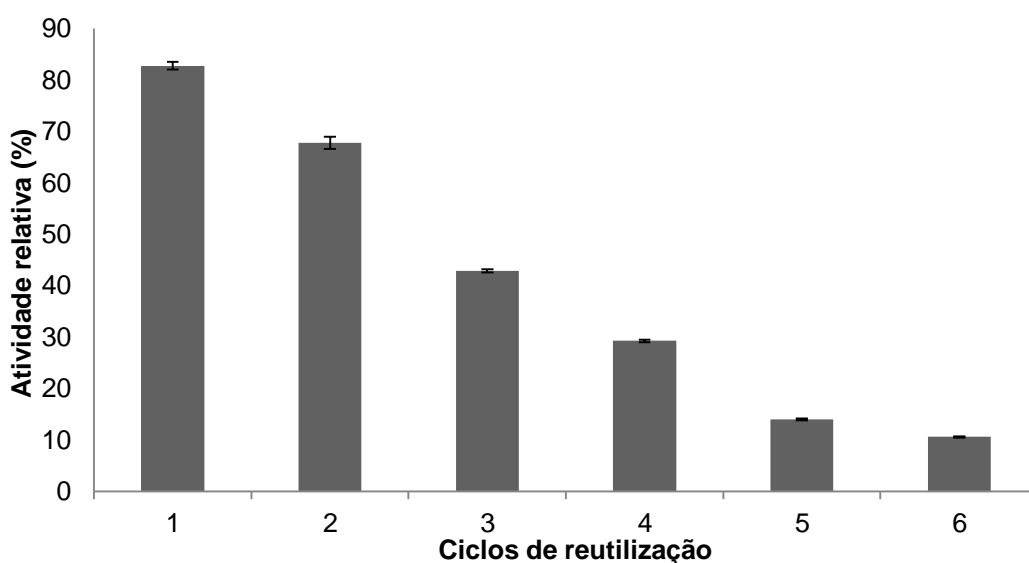


Figura 1: Reutilização em atividade proteolítica da enzima produzida por *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 e imobilizada em esferas de alginato de cálcio (CaCl_2 0,6M, Alginato de sódio 4%)

3.3. Parâmetros bioquímicos

3.3.1 Efeito da temperatura na atividade da enzima livre e imobilizada

A estabilidade a temperatura de uma enzima é um importante parâmetro para a aplicação industrial de enzimas, visto que, em geral as reações químicas industriais são realizadas a altas temperaturas e podem danificar ou desnaturar a estrutura química da enzima (TERCAN, 2011), por isso

bioprocessos que busquem melhorar a estabilidade enzimática a temperatura são amplamente necessários.

O perfil da atividade proteolítica em diferentes temperaturas está apresentado na Figura 2A. A temperaturas ótimas para a atividade da protease livre e imobilizada foi de 50°C para ambas, indicando que neste suporte de imobilização não houve alteração das propriedades físico-químicas da molécula. Entretanto, ao avaliar a estabilidade térmica da protease livre e imobilizada (Figura 2B) no tempo de 180 minutos, observou-se que a protease livre apresentou estabilidade na faixa 20-30°C enquanto que a enzima imobilizada apresentou-se estável na faixa de 20-40°C e para todas as temperaturas avaliadas a enzima imobilizada apresentou atividade residual superior quando em comparação com a enzima livre.

Resultados que corroboram como os obtidos por Andriani et al. (2012) quando estudaram o efeito da temperatura sob a atividade da enzima celulase obtida de *B. subtilis* TD6 livre e imobilizada pela técnica de aprisionamento em esferas alginato de cálcio e observaram que este material reteve a estrutura terciária da enzima em temperaturas mais altas, observando maior taxa de desnaturação na enzima livre nas mesmas condições experimentais.

3.3.2. Efeito do pH na atividade da enzima livre e imobilizada

O pH ótimo para a enzima livre foi de 7,0 e 9,0 para a enzima imobilizada (Figura 2C). A diferença no pH ideal da atividade enzimática é frequentemente verificado em processos de imobilização, as esferas de alginato com a enzima aprisionada produz um microambiente carregado que pode afetar a natureza da proteína da enzima ativa e alterar o pH da enzima aprisionada (DE OLIVEIRA et al., 2018; NOROUZIAN, 2003). A protease imobilizada apresentou maior estabilidade para todas as faixas de pH avaliados, mantendo cerca de 97% sua atividade entre 5,0 -9,0 após 24 horas (Figura 2D) .

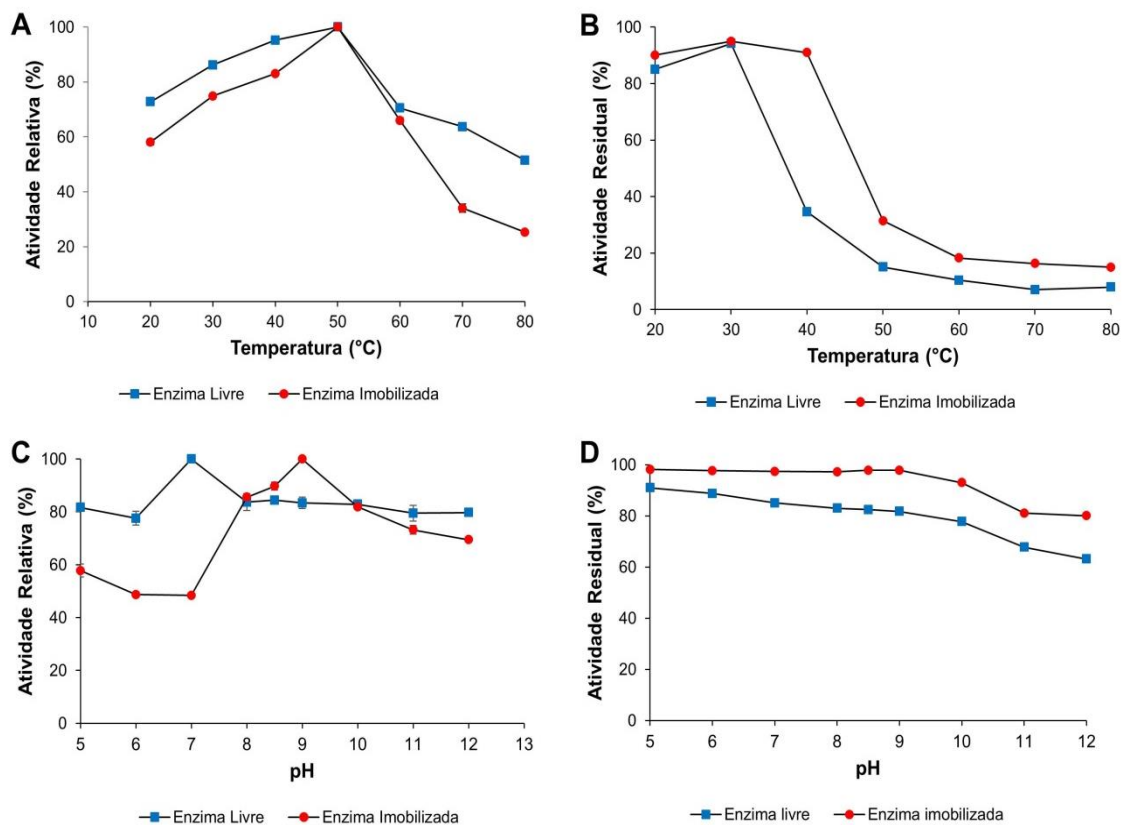


Figura 2. Caracterização bioquímica parcial da protease produzida por *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 livre e imobilizada. (A) Temperatura ótima da enzima livre e imobilizada, (B) Estabilidade a diferentes temperaturas da enzima livre e imobilizada no tempo de 180 minutos, (C) pH ótimo da enzima livre e imobilizada, (D) Estabilidade a diferentes pH da enzima livre e imobilizada no tempo de 24 horas.

4. CONCLUSÃO

A imobilização da protease colagenolítica produzida pelo fungo *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 em esferas alginato de cálcio pela técnica de aprisionamento foi eficiente, não apenas por manter suas propriedades, mas melhorou significativamente sua estabilidade térmica e ao pH, permitindo a reutilização por seis ciclos e manutenção da atividade após sete dias de armazenamento. A imobilização da protease colagenolítica em alginato é uma técnica viável para a aplicação enzimática em processos industriais que apresentem condições adversas para as enzimas livres.

5. REFERÊNCIAS

ANDRIANI, D. et al. Immobilization of cellulase from newly isolated strain *Bacillus subtilis* TD6 using calcium alginate as a support material. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1–2, p. 29–33, 2012.

ANWAR, A. et al. Calcium alginate : a support material for immobilization of proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, n. 10, p. 1281–1286, 2009.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

BHAGWAT, P. K.; DANDGE, P. B. Collagen and collagenolytic proteases: A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 15, p. 43–55, 2018.

BICKERSTAFF G.F. "Immobilization of Enzymes and Cells". In: Bickerstaff G.F. (eds) **Immobilization of Enzymes and Cells. Methods in Biotechnology**, vol 1. p. 1-11. Humana Press. 1997.

CHAVIRA, R. J.; BURNETT, T. J.; HAGEMAN, J. H. Assaying Proteinases with Azocoll. **Analytical Biochemistry**, v. 136, n. 1, p. 446–450, 1984.

DE OLIVEIRA, R. L. et al. Immobilization of pectinase from *Aspergillus aculeatus* in alginate beads and clarification of apple and umbu juices in a packed bed reactor. **Food and Bioproducts Processing**, v. 109, p. 9–18, 2018a.

DE OLIVEIRA, R. L.; SILVA, M. F. DA; PORTO, T. S. Imobilização da frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* por aprisionamento em alginato e ágar-ágar. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 7, n. 2, p. 17–21, 2017b.

GURUMALLESH, P. et al. A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 128, p. 254–267, 2019.

HAJJI, M. et al. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Periploca laevigata* root barks. **Food Chemistry**, v. 121, n. 3, p. 724–731, 2010.

KUMAR; SINGH, D. Global scenario of industrial enzyme market Complimentary Contributor Copy. **Industrial Enzymes**, v. 10, p. 173–196,

2014.

LEIGHTON, T. J. et al. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Biology**, v. 76, n. 1, p. 103–122, 1973.

MESQUITA, M. V. N. et al. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas Enzymatic immobilizations in polymeric matrixes. **Boletim Informativo Geum**. V. 9, n. 2, p. 38–50, 2018.

PETZOLD, G. et al. Alginate as a versatile polymer matrix with biomedical and food applications. **Materials for Biomedical Engineering**, p. 323–350, 2019.

REHMAN, H. U. et al. Degradation of complex carbohydrate: Immobilization of pectinase from *Bacillus licheniformis* KIBGE-IB21 using calcium alginate as a support. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 1081–1086, 2013.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397–430, 2008.

ROMERO-FERNÁNDEZ, M.; PARADISI, F. Protein immobilization technology for flow biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 55, p. 1–8, 2020.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SOUZA, L. T. A.; VERÍSSIMO, L. A. A.; JOÃO, B. C. P.; SANTORO, M. M.; RESENDE, R.R.; MENDES, A. A.; "Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte", p. 529 -568. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. São Paulo: Blucher, 2017.

TERCAN, Ç. IMMOBILIZATION OF THERMOPHILIC RECOMBINANT ESTERASE ENZYME BY MICROENCAPSULATION IN ALGINATE- BEADS A Thesis Submitted to. **Graduate School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology**. p. 1–83, 2011.

WANDERLEY, M. C. DE A. et al. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 13–24, 2017.

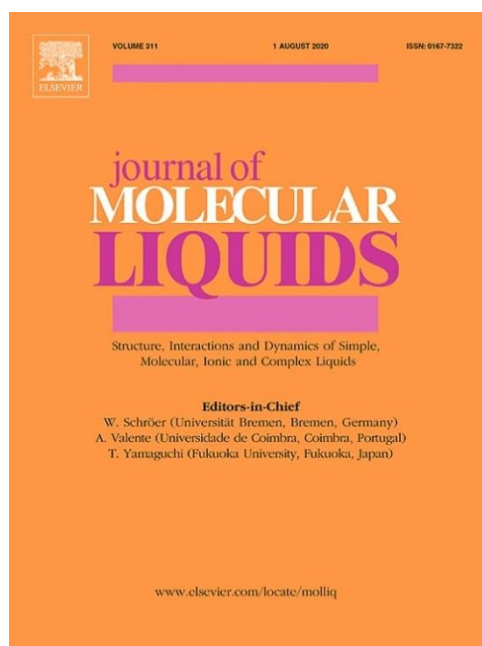
CAPÍTULO II:

Extraction of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease by aqueous two-phase systems PEG/citrate: a kinetic and thermodynamic study

Lígia Maria Gonçalves Fernandes, Márcia Nieves Carneiro da Cunha, Jônatas de Carvalho Silva, Ana Lúcia Figueiredo Porto, Tatiana Souza Porto

Este artigo será submetido à revista:

Journal of Molecular Liquids



ISSN: 0167-7322

Cite Score: 8.1 Impact Factor: 5.065

Extraction of a novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease by aqueous two-phase systems PEG/citrate: a kinetic and thermodynamic study

Lígia Maria Gonçalves Fernandes¹, Márcia Nieves Carneiro da Cunha¹, Jônatas de Carvalho Silva¹, Ana Lúcia Figueiredo Porto¹, Tatiana Souza Porto^{*2}

¹ Department of Animal Morphology and Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Dois Irmãos, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

² Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Bom Pastor, Boa Vista, 55296-901 Garanhuns, PE, Brazil.

*Corresponding author

Tatiana Souza Porto

Tel: +55 81987876831

E-mail address: portots@gmail.com

Federal Rural University of Pernambuco - Academic Unit of Garanhuns,
Garanhuns, PE 55292-270, Brazil.

ABSTRACT

A novel *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease was extracted by aqueous two-phase systems (PEG/citrate). The extraction was performed by factorial design 2^4 for analyzing the effects of independent variables named PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}), sodium citrate concentration (C_{CIT}) and pH. Afterwards, protease extracted was used for casein hydrolysis and characterized in terms of kinetic and thermodynamic parameters. Protease partitioned preferentially for the PEG rich phase whose highest purification factor ($PF = 8.5$) was obtained using M_{PEG} 8000 g/mol, C_{PEG} 24%, C_{CIT} 15% and pH 6.0. Under this condition protease activity was yielded in 162%. Despite the enzyme acted optimally at 50°C and pH 8.0; it was more stable in lower temperatures (10-30°C) and acid pH conditions (5.0-6.0). The kinetic parameters of activation for casein hydrolysis revealed higher affinity by casein ($K_M = 2.8$ mg/mL) with maximum catalysis rate of 45.0 U/mL. The reaction activation energy and the standard enthalpy variation of enzyme unfolding were 24.2 and 54.2 kJ/mol, respectively. Protease-catalyzed casein hydrolysis at 25°C, showed activation Gibbs free energy, enthalpy and entropy of 65.8 kJ/mol, 21.8 kJ/mol and -146.7 J/mol.K, respectively. The thermodynamic parameters of protease thermo inactivation suggested a predominating mechanism of reversible unfolding since the inactivation Gibbs free energy increased from 91.0 to 102.3 kJ/mol. These results displayed the great potential of the protease to be exploited in industrial applications.

Keywords: ATPS; Aqueous two-phase systems; Protease activity; *Aspergillus heteromorphus*; Kinetics; Thermodynamics.

1. INTRODUCTION

Proteases are hydrolytic enzymes which degrade proteins into small peptides and amino acids. They are found in all living organisms and comprise a notable group of biocatalysts with a broad scope of application according to their biochemical features and substrate specificity. They represent approximately 60% of the industrial enzymes marketed with a compound annual growth rate of 5.3 % from 2014 to 2019 [1].

Proteases display specific activities which are applicable in several industrial sectors, i.e., meat tenderization, peptide synthesis, infantile formula preparations, baking, brewing, leather processing, bioremediation processes, detergent, textile, food and pharmaceuticals industries [1,2].

Microorganisms represent an excellent source of proteases, mainly sources of industrial productions. Despite proteolytic enzymes can be obtained from animals and plants, microorganisms are the main producers due to their economic and technical advantages, besides their biochemical diversity and the possibility of genetic manipulation [3]. Fungi such as *Aspergillus* genus, are commonly used in the industrial practice because of their ability to release extracellular enzymes at high concentration. Moreover, they offer additional advantages over bacteria during the downstream processing can produce a variety of extracellular proteases [4].

Most fermentative processes result in a complex combination of proteins and other metabolites or cell debris which difficult the separation and purification steps [5]. Approximately 90% of the final cost are due to the purification techniques, since they are costly, labor and time consuming such as chromatographic techniques[6]. Then, the use of alternative methods of purification is desired in some process, e.g., food industry, which does not require high levels of purification.

One of the most promising processes of bioseparation is liquid-liquid extraction using two-phase aqueous systems (ATPS), which can be used in the initial stages of a purification process, separations, or even in subsequent purification stages [7]. Such an extraction technique has advantages over conventional protein separation and has accumulated a lot of interest from the

scientific community due to its mild operating conditions, ease of scaling-up, capable of continuous, environment-friendly and low cost[6,7,8].

However, after treatment as purification, the new biocatalyst may suffer conformational or electronic changes in its structure and surface, hence, some features may be changed. Then, it necessary to proceed a kinetic, thermodynamic and biochemical characterization in order to evaluate the biotechnological potential and get relevant information for its industrial applications, whose combined use allow predicting its behavior under conditions not tested experimentally. Furthermore, knowledge of the influence of inhibitors or activators reagents can enhance and preserve their activity for a long period of time [11].

Based on this background, the present work aimed to extract a novel protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 by aqueous two-phase system PEG/Citrate. The extracted protease was characterized in term of its biochemical, kinetic and thermodynamic parameters.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Microorganism

Aspergillus heteromorphus URM0269 was obtained from the URM (University Recife Mycology) culture collection of the Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, affiliated to the World Federation for Culture Collections (WFCC), N°604. It was maintained in potato dextrose agar medium at 30°C for 7 days to induce sporulation. The spores were then collected after addition of 5.0 mL of 0.9% (w/v) NaCl and 0.01% (v/v) Tween 80 solution sterilized previously at 121°C for 20 min.

2.2 Protease production

Solid-state fermentation (SSF) was conducted in 125 mL-Erlenmeyer flasks containing 3g of wheat bran as substrate for 96 h at 30°C. The substrate

had moisture of 20% made up by inoculum 10^6 spores/mL and nutritive solutions. The enzyme extract was obtained by addition of 7.5 mL of 0.1 M sodium phosphate solution (pH 7.0) per gram of fermented material and homogenized in shaker for 1 h. Solids were finally removed, centrifuged and vacuum filtrated. The enzymatic extract was used for ATPS extraction.

2.3 Total proteolytic activity

Protease activity was measured as described by Leighton et al. [12] with few modifications. Briefly, 0.15 mL of enzyme extract was mixed with 0.25 mL of azocasein solution (10 mg/mL w/v of Azo dye-impregnated casein dissolved in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.4) for 60 min at 25°C. The reaction was stopped by adding 1.2 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid. Samples were centrifuged at 8000rpm (Z326K – HERMLE Labortechnik GmbH) for 15 min at 4°C. Afterward, 0.8 mL of the supernatant was added into 1.4 mL of 1.0 M NaOH. One protease unit was defined as the amount of enzyme able to lead to a 0.1 increase in absorbance at λ 420 nm with in 1h.

2.4 Aqueous two-phase systems

A concentrated solution of sodium citrate (30% w/w) was prepared by mixing appropriate quantities of equimolar solutions of dehydrate tri-sodium citrate and monohydrate citric acid monohydrate in different pH values (6.0, 7.0 and 8.0) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Amounts of the above solutions were mixed in 15-mL graduated conical tubes tips including polyethylene glycol (PEG) solutions with different molar masses according codifications led by 2^4 factorial design (Table 1). The influence of the independents variables PEG molar mass (M_{PEG}), PEG concentration (C_{PEG}), sodium citrate concentration (C_{CIT}) and pH were investigated. The crude extract represented for 20% (w/w) of total mass. After water addition up to a final mass of 10 g, the suspensions were then homogenized in a vortex for 1 min, and the two phases were separated by settling for 2 h. The volumes of the top and bottom phases were measured, and the phases were withdrawn separately with pipettes for analysis. Statistical analysis were performed using the software Stasoft 8.0.

Table 1. Factors levels used in the 2^4 experimental design for protease extraction by the PEG/Citrate ATPS.

Variable	Levels		
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)
M_{PEG} (g/mol)	400	3350	8000
C_{PEG} (%w/w)	20.0	22.0	24.0
C_{CIT} (% w/w)	15.0	17.5	20.0
pH	6.0	7.0	8.0

PEG molar mass; PEG concentration; Citrate concentration

2.5 Determining the partition coefficient, the purification factor and the yield

Protease partition coefficient (K) was defined as the ratio of the volumetric enzyme activity in the top phase (A_T) over that in the bottom phase (A_B):

$$K = \frac{A_T}{A_B} \quad (2)$$

The activity yield (Y) was defined as the ratio of total activity in the top phase over that in initial extract expressed as a percentage:

$$Y = \left(\frac{A_T V_T}{A_0 V_0} \right) \times 100 \quad (3)$$

The purification factor (PF) was defined as the ratio of the specific activity in the top phase (A_T/P_T) to the specific activity in the crude extract before partition (A_0/P_0):

$$PF = \frac{A_T/P_T}{A_0/P_0} \quad (4)$$

The total protein concentration was determined following the method described by Bradford,[13].

2.6 Biochemical characterization

2.6.1 Effect of pH on protease activity and stability

Protease activity was determined in triplicate by incubating the enzyme in ATPS with 10 mg/mL azocasein solutions prepared in different 0.2 M buffers, namely citrate phosphate (pH 5.0-7.0), Tris-HCl (pH 7.0 -9.0) and glycine-NaOH (pH 9.0-12.0) at 25°C for 60 min. Such an activity was then expressed as percent relative activity compared with the maximum value and the results were expressed as means and standard deviations. Protease stability was determined by incubating the enzyme-containing samples in the above buffers without azocasein, assessing the enzyme activity at different times (0, 4, 8, 12 and 24 h) expressing as percent residual activity compared with the initial value.

2.6.2 Effect of temperature on protease activity and stability

The effect of temperature on the initial protease activity was investigated between 20 and 80°C using a 10-mg/mL azocasein solution in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.4). The relative activity was calculated (%) based in the highest protease initial activity. Protease stability was determined by incubating the enzyme (ATPS) in the above buffer without azocasein, assessing the enzyme activity at different times during 60 h and expressing it as percent residual activity compared with the initial value (100%). All the experiments were performed in triplicate, and the results expressed as means and standard deviations.

2.6.3 Effects of metal ions on protease activity

The influence of ions on the protease activity was evaluated incubating protease in ATPS at 28 °C for 30 min within 5 mM and 10 mM ions solutions (K^+ , Na^+ , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} and Ca^{2+}) made up in 0.2 M Tris-HCl, pH 7.4. The enzyme activity without ions was considered as control (100%).

2.6.4 Effect of inhibitors on protease activity

The effects of other components such as *Tosil lysine chloromethyl ketone* (TLCK), *Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone* (TPCK), phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 2-mercaptoethanol, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and iodoacetic acid, on the protease activity in ATPS were evaluated in concentrations of 5mM and 10mM, incubated for 30 min at 25°C. The control did not receive components.

2.7 Kinetic and thermodynamic parameters of the protease reaction

Protease activity was assessed varying the initial azocasein concentration from 2 to 40 mg/mL at 25°C. Michaelis constant (K_M) and maximum reaction rate (V_{MAX}) were estimated fitting the experimental data in the software Origin 8 using the Michaelis-Menten model (Eq. 5), while the catalytic constant (k_{CAT}) was calculated as the ratio of V_{MAX} to the total concentration of the enzyme (E_0) in the PEG rich phase.

$$v = \frac{V_{MAX}*[S]}{K_M+[S]} \quad (5)$$

Where [S] is the initial concentration of azocasein.

The energy of activation (E^*) and standard enthalpy variation of the unfolding equilibrium (ΔH^0_u) were then estimated from the slopes of the right and left straight lines, respectively, which were obtained plotting in a semi-log plot the starting enzyme activity versus 1/T according the following equation:

$$k_{(o)} = \frac{A_o \exp(-E^*/RT)}{1 + B \exp(-\Delta H^0_u/RT)} \quad (6)$$

where A_o and B are additional pre-exponential factors, R is the gas constant and T the absolute temperature.

Free energy (ΔG^*), enthalpy (ΔH^*) and entropy (ΔS^*) activation were calculated by the equations:

$$\Delta G^* = -RT \ln \left(\frac{k_{cat} h}{k_b T} \right) \quad (7)$$

$$\Delta H^* = E^* - RT \quad (8)$$

$$\Delta S^* = \frac{(\Delta H^* - \Delta G^*)}{T} \quad (9)$$

where h is the Planck constant and k_b the Boltzmann one.

2.8 Kinetic and thermodynamic parameters of the enzyme thermal inactivation

Despite the acceleration of the enzyme reaction, an increase in temperature promotes not only the above enzyme unfolding but also the subsequent denaturation of its structure. Such a decay is proportional to the enzyme activity and then, can be calculated by Eq. 10

$$\frac{dA}{dt} = -k_d * A \quad (10)$$

Where t is the time of exposure at a given temperature and k_d the first-order denaturation constant. The k_d values were determined from 10 to 50°C by the slope of the straight line from the semi-log plot of the ratio of residual activity to the initial activity ($\ln A = A_f/A_i$) versus the exposition time (during 30 min), while the activation energy of denaturation (E_d^*) was estimated by the Arrhenius equation (Eq. 6), where k_o was replaced by k_d at each temperature.

The half-life ($t_{1/2}$) is the time after which the enzyme activity suffers a reduction to one-half of its initial activity:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (11)$$

The D -value is the time needed for a 10-fold reduction of the initial activity at a given temperature, which is related with k_d by the equation:

$$D = \frac{\ln 10}{k_d} \quad (12)$$

The thermodynamic parameters of protease thermo inactivation in ATPS ΔG^*_d , ΔH^*_d and ΔS^*_d were estimated by the equations 7, 8 and 9, respectively. However, E^* was replaced by E_d and k_{CAT} by k_d .

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Protease extraction by ATPS PEG/citrate

As possible to see in Table 2, the assay 1, 3, 9 and 11 did not display two phases separation. Those systems were made up with molar mass 400 g/mol and 15% citrate concentration. According to Porto et al [14] some ATPS under these conditions may be found below the binodal curve, which delimits the phase separation threshold.

3.1.1 Partition coefficient (K)

Protease from *A. heteromorphus* URM 0269 partitioned preferentially for the PEG-rich phase, since all K values were found to be above 1. Such a partitioning was more pronounced in high level of citrate concentration (24%) associated with low PEG molar mass (400 g/mol), e.g. assays 7 and 15. Protein migration in ATPS may be governed by two phenomena named salting out and volume exclusion effects. Salting out effect explains the reason of a decay in biomolecules solubility in the salt-rich phase (bottom) increasing the salt concentration, while the volume exclusion effect in the polymer-rich phase suggests that the volume occupied by the polymer increases with either polymer concentration or molar mass, which push the molecules for partitioning in the salt-rich phase [14,15]

Salting out effect may be also correlated with protein dielectric constant and its polarization due to specific interaction within the solvent environment. Polar environments lead for a reorganization of the polar molecules along the electric field lines generated by dipoles in the protein. Salts can change the electrostatic charge of ATPS and influence the distribution of charges on the protein surfaces. Furthermore, in the salt-rich phase, anions and cations can

neutralize charges on the protein surface or even have their non-covalent bonds with water broken. Hence, they become insoluble preferring the PEG-rich phase which is more hydrophobic [11].

Table 2. Extraction of protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 using factorial design 2^4 by aqueous two-phase systems.

Assay	M_{PEG} (g/mol)	C_{PEG} (%)	C_{CIT} (%)	pH	PA_{T} (U/mL)	K	Y (%)	PF
1	400	20	15	6	***	***	***	***
2	8000	20	15	6	26.9	1.44	89.01	5.63
3	400	24	15	6	***	***	***	***
4	8000	24	15	6	36.3	2.07	144.13	7.59
5	400	20	20	6	43.2	9.06	178.68	2.42
6	8000	20	20	6	43.1	3.87	128.35	3.86
7	400	24	20	6	48.1	37.9	159.04	3.49
8	8000	24	20	6	46.0	7.97	144.60	6.67
9	400	20	15	8	***	***	***	***
10	8000	20	15	8	34.3	1.59	119.05	6.26
11	400	24	15	8	***	***	***	***
12	8000	24	15	8	41.4	2.59	157.53	7.83
13	400	20	20	8	48.8	9.08	177.50	2.63
14	8000	20	20	8	49.4	4.93	171.74	5.92
15	400	24	20	8	55.5	61.6	174.35	4.19
16	8000	24	20	8	45.7	5.74	143.76	3.77
17	3350	22	17.5	7	40.7	2.16	137.92	6.66
18	3350	22	17.5	7	40.8	2.03	148.50	7.45
19	3350	22	17.5	7	40.6	2.11	141.17	6.39
20	3350	22	17.5	7	40.9	2.10	142.21	6.50

C_{PEG} -PEG concentration; M_{PEG} - PEG molar mass; C_{CIT} - citrate concentration; PA_{T} - protease activity in the top phase, K - partition coefficient; Y – activity yield; PF - purification factor; *** assays which did not form two-phases.

Table 3 displays the independent variables effects PEG molar mass, PEG concentration, citrate salt concentration and pH (first order), as also for the interactions between them (second and third order). These effects were

determined for analyzing the responses partition coefficient, protease activity yield, and purification factor.

Table 3. Effects and interactions of *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease extraction by aqueous two-phase systems PEG/Citrate using a factorial design 2⁴.

Variables effects and Interactions	Extraction responses		
	<i>K</i>	<i>Y</i>	<i>PF</i>
M _{PEG}	-406,43*	23,07*	18,09*
C _{PEG}	408,61*	3,34*	3,55*
C _{CIT}	615,55*	43,68*	2,93
pH	107,03*	5,65*	0,49
M _{PEG} x C _{PEG}	-347,70*	5,91*	0,82
M _{PEG} x C _{CIT}	-477,92*	-34,49*	-10,30*
M _{PEG} x pH	-112,46*	4,06*	-0,45
C _{PEG} x C _{CIT}	393,40*	-7,23*	-0,13
C _{PEG} x pH	96,28*	-2,51	-2,52
C _{CIT} x pH	101,49*	0,75	-0,41
M _{PEG} x C _{PEG} x C _{CIT}	-362,92*	-4,66*	-2,85
M _{PEG} x C _{PEG} x pH	-123,46*	-4,37*	-3,03
M _{PEG} x C _{CIT} x pH	-118,69*	-0,85	-1,35
C _{PEG} x C _{CIT} x pH	92,88*	-0,63	-2,12

C_{PEG}.PEG concentration; M_{PEG} - PEG molar mass; C_{CIT} - citrate concentration; *K*- partition coefficient; *Y* – activity yield; *PF* - purification factor; * Statistically significant p < 0.05.

Analyzing the variable effects and their interactions for the partition coefficient (*K*) response (Table 3), It is possible to see that C_{CIT} was the variable which most influenced the protease partition for PEG-rich phase. Its positive signal suggests that high levels of citrate concentration favored the salting out effect. Likewise, M_{PEG} had a negative significant effect, which means that in lower level of PEG molar mass (400 g/mol) the protease had more space to migrate, characterized for the opposite volume exclusion effect. Those effects are in accordance with their interactions (M_{PEG} x C_{CIT}), second most significant effect, whose negative signal suggested an antagonism interaction between them. On other words, the protease partitioned preferentially for PEG-rich phase in high level of the variable which influenced positively the most (C_{CIT}),

along to low level of the variable which less influenced positively or most influenced negatively (M_{PEG}).

3.1.2 Protease Activity yield

Protease activity yield after extraction by ATPS are listed in Table 2. These results taken together are very promising, because all the tests carried out according to the factorial design 2^4 , except assay 2, provided activity yield (Y) values $>100\%$. The highest proteolytic activity yield (178.68%) was obtained under conditions of 400 g/mol M_{PEG} , 20% C_{PEG} , 20% C_{CIT} at pH 6.0. It is important point out that ATPS PEG/Citrate conferred a pleasant environment for extract the protease from *A. heteromorphus* URM 0269.

Despite the independent variables C_{CIT} and M_{PEG} (Table 3), which most influenced Y values, displayed significant positive signals, their interaction was significantly negative, same trend was observed for K response. The highest Y values (assay 5 and 13) were obtained in M_{PEG} 400 g/mol and C_{CIT} 20%, indicating a possible hydrophobic characteristic of the enzymatic surface [16]. To better understand such an interaction Fig. 1A displays a diagram of geometric interpretation between M_{PEG} and C_{CIT} .

3.1.3 Purification factor (PF)

ATPS PEG/Citrate allowed to partition the protease with high PF values for almost all systems (Table 2). The highest purification factor was obtained under conditions of M_{PEG} 8000 ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), C_{PEG} 24% (w/w), C_{CIT} 15% (w/w) at pH 8.0. M_{PEG} was the independent variable which most influence the purification factor positively in the PEG-rich phase. Despite C_{CIT} did not display a significant influence, its interaction with M_{PEG} was the second effect which most influenced the response PF . However, such interaction was negative, as explained above, the protease purified preferentially in the PEG-rich phase in high level of the variable which most influenced positively the response (M_{PEG}), along to low level of the variable which less influenced positively (C_{CIT}) (Fig. 1B).

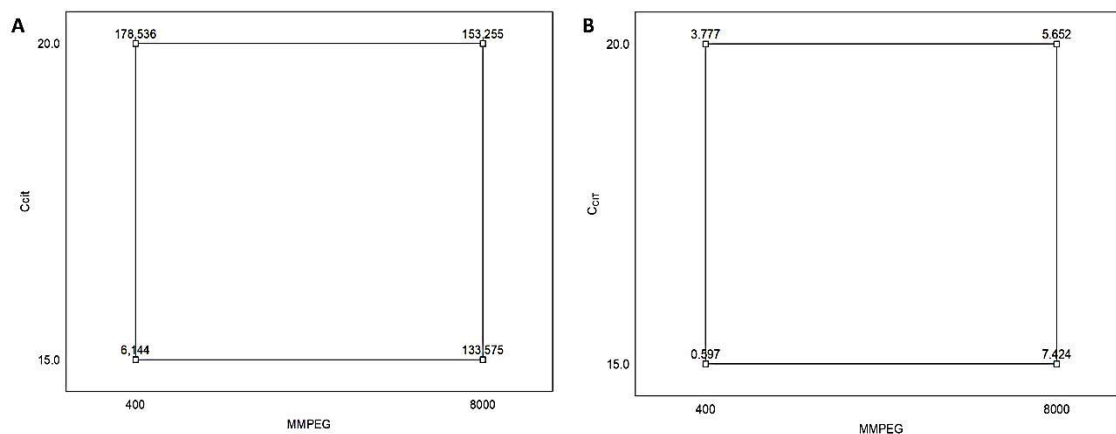


Fig. 1. Diagram of geometric interpretation of the interaction between citrate concentration (C_{CIT} , % w/w) and PEG molar mass (M_{PEG} , g/mol) on the activity yield (Y) in the top phase (A), and on the purification factor (PF) in the top phase (B).

The high purification factor values found in the present work are even better than those reported by some authors using low and high definition purification techniques sequentially. Salihi, Asoodeh and Aliabadian [17] purified alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93 by ammonium sulfate precipitation and Q-sepharose chromatography and reported final yield of 18.1% and purification factor of 1.3. Abbod et al. [18] purified a protease from *Nocardiosis dassonvillei* NRC2aza sequentially using ammonium sulphate precipitation and chromatography techniques and obtained values of 6.2 (PF) and 3.3% (Y). Yadav et al [19] purified sequentially an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant by acetone precipitation, ion exchange and Sephadex G-75 chromatography techniques and yielded 21.0% of the initial activity. Then, ATPS PEG/Citrate displayed good performance with high PF and Y values in a single step, which confers a significant economic benefit during industrial applications [20].

3.2 Biochemical characterization of extracted protease by ATPS

During industrial applications protein may suffer structural changes upon temperature and pH variation, hence the stability becomes a crucial parameter to increase the shelf-life and prolong its use[21]. Then, protease extracted in ATPS PEG/Citrate, under conditions of M_{PEG} 8000 ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), C_{PEG} 24% (w/w),

C_{CIT} 15% (w/w) at pH 8.0, which displayed the highest *PF* value, was characterized in terms of its biochemical features.

3.2.1 pH and temperature effects on the protease activity and stability

Protease in ATPS PEG/Citrate acted optimally at pH 8.0 (Fig 2A). However, it was stable in acid condition maintaining more than 70% of its initial activity after 24 h of incubation (Fig. 2b). According [22] the optimum pH can vary from 5.0 to 10.0, depending on several factors, among which the type of microorganism. Some authors reported optimal pH values under alkaline conditions for fungal protease. For instance, *Aspergillus oryzae* CH93 protease was active between pH 3.0 and 10.0 [17]. Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634 had optimum pH 9.0 [23]

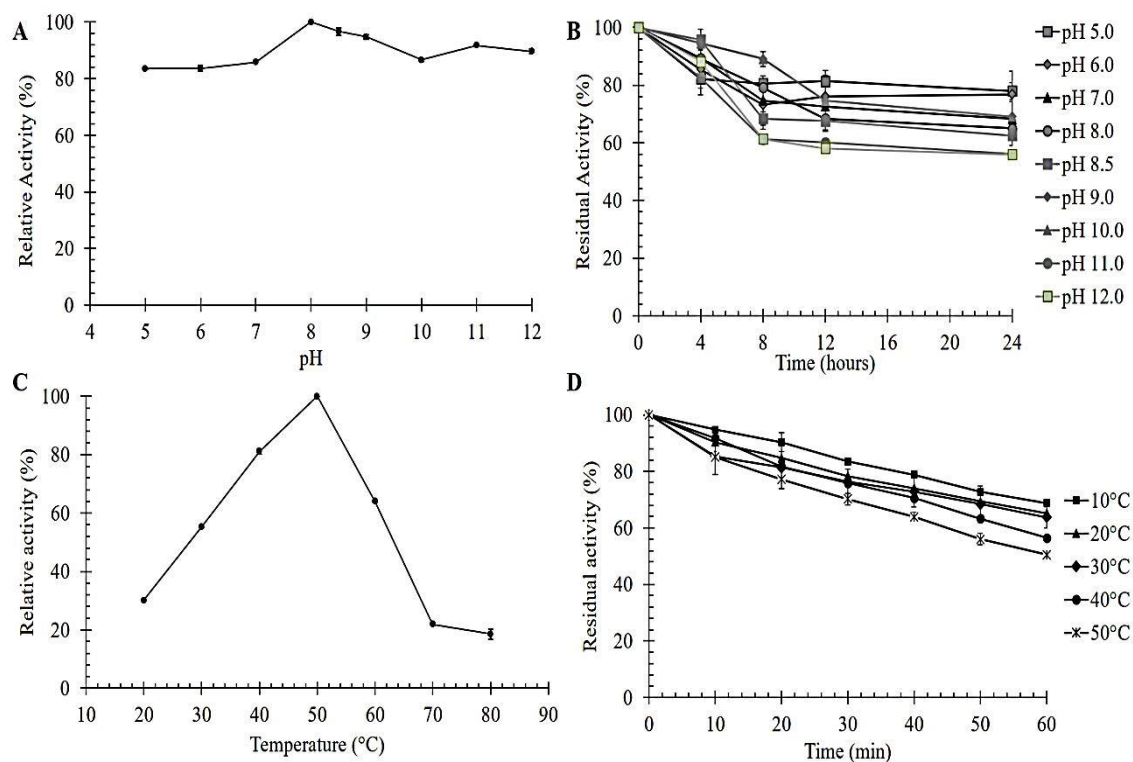


Fig.2. Biochemical characterization of protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 extracted by Aqueous Two-Phase System PEG/Citrate. (A) Relative activity profile versus pH, (B) Effects of pH on the stability of the protease, (C) Relative activity profile versus temperature and (D) Effect of temperature on the stability of the protease

The proteolytic enzyme in ATPS displayed optimum temperature at 50°C (Fig. 2C). It usually acts optimally between 35°C to 70°C [22]. However, under this temperature only 50.5% of the initial activity was maintained after 60 min of incubation. Similar trend of stability was observed for protease from *Aspergillus oryzae* CH93, which was unstable at temperatures higher than 50°C [17]. However, under this temperature only 50.5% of the initial activity was maintained after 60 min of incubation (Fig. 2D).

3.2.2 Effect of metal ions and inhibitors on enzyme activity

Some metal ions may influence the enzymes activity by either inhibition or activation [24,25]. As possible to see in Table 4 the enzymatic activity was activated in the presence of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} and Mg^{2+} , while Fe^{2+} (5 and 10 mM) and Cu^{2+} (5 mM) displayed a slightly inhibition. Same behavior was reported by Silva et al. [26] for the protease from *Aspergillus tamaris* URM4634. Effect of 5.0 mM and 10.0 mM of inhibitors such as TLCK a trypsin inhibitor, TPCK a chymotrypsin inhibitors, PMSF a classical serine protease inhibitor, EDTA a chelator of divalent ions (metalloprotease) and Iodoacetic acid and β -Mercaptoetanol cysteine protease inhibitors was examined on protease activity.

Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) was the compound which most inhibited the protease activity. Such an inhibition was more pronounced in higher concentration (10 mM), which is characteristic of a serine protease. A similar profile was observed by Nascimento et al. [27], a total inhibition of a protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 extracted by ATPS (PEG-Sulfate) in 5.0 mM of PMSF.

Secondly, Iodoacetic acid had a negative influence on the protease activity, whose inhibition was more pronounced when the concentration was increased to 10 mM, which means that it is a cysteine proteolytic inhibitor.

EDTA is an agent which acts chelating metal ion present in the enzyme structure. When occurs such an inhibition the enzyme is characterized as metalloprotease. However, a slightly decay, like that observed in Table 4 (-24%), does not have expressive requirement of metallic ions for either enzyme stability or activity [28].

Table 4. Effects of inhibitors and metal ions on the proteolytic activity

Metal ions	Residual activity (%)	
	5.0 mM	10 mM
Control	100	100
K ⁺	132.00	121.26
Na ⁺	137.89	121.89
Zn ²⁺	102.73	102.94
Ca ²⁺	122.73	142.73
Mg ²⁺	113.26	138.52
Cu ²⁺	86.31	101.89
Fe ²⁺	97.05	93.89
Inhibitors		
Control	100	100
TLCK	81.26	85.05
TPCK	91.78	92.84
PMSF	21.68	17.68
EDTA	70.32	75.90
Iodoacetic acid	80.74	46.23
β -Mercaptoetanol	76.74	60.00

TLCK (Tosil lysine *chloromethyl ketone*), TPCK (*Tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone*), PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid).

3.2.3 Kinetics and thermodynamics of protease activation

The maximum reaction rate (V_{max}), Michaelis constant (K_M) (Fig 3A) and catalytic constant (k_{cat}) were 45.0 U/mL, 2.8 mg/mL and 18.5 s⁻¹, respectively. The activation energy for casein hydrolysis was 24.2 kJ/mol, which means that the protease required low energy to activate the reaction in alkaline medium. On other hand, the standard enthalpy variation of the unfolding equilibrium of protease in ATPS (ΔH_u^0) was 54.2 kJ/mol, which suggest that the biocatalyst was more affected by elevated temperatures (Fig. 3B).

Casein degradation to smaller peptides and amino acids occurs at a rate depending on collisions between protease and casein molecules for formation of the enzymes-substrate complex [29]. However, such a reaction starts only if this complex has activation energy (E^*) to activate it. Enzymes like protease reduces E^* of protein degradation, hence accelerating the reaction. Thereby, small values are desired in industrial applications, because they kinetically favor the reactions requiring less energy costs. Likewise, lower value of ΔH_u^0 means

that the enzymes unfolded form is less pronounced. E^* value of *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 protease in ATPS was between that those reported by Da Silva et al. [30] who reported E^* values of 32.4 and 16.2 kJ/mol for crude extract and purified alkaline protease from *Aspergillus tamaris* URM 4634. Hernández-Martínez et al. [31] reported higher value (62 kJ/mol) for an alkaline protease from *Aspergillus fumigatus*. Some other authors reported lower E^* values for proteases from *Aspergillus foetidus* (19.03 kJ/mol)[4] and *Bacillus stearothermophilus* (17.3 kJ/mol)[32].

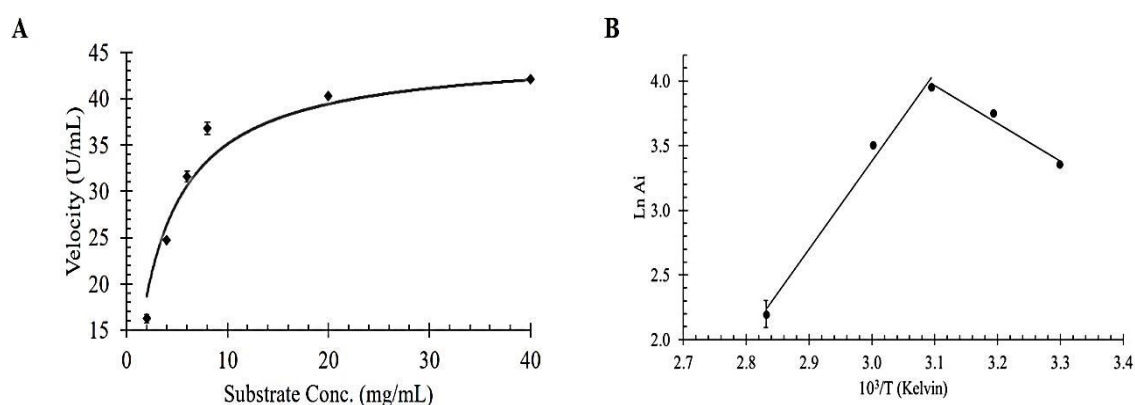


Fig. 3. Azocasein hydrolysis by protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in aqueous two-phase system PEG/Citrate. Solid line represents the fitting curve drawn according to Michaelis-Menten equation ($R^2 = 0.95$). Arrhenius-type semi-log plot of initial activity versus the reciprocal temperature [$R^2 = 0.98$ (E^*); and 0.99 (ΔH_u^0)].

The free Gibbs energy (ΔG^*), enthalpy (ΔH^*) and entropy (ΔS^*) of casein hydrolysis activation, which were estimated at 25°C and pH 7.4, were found to be 65.8 kJ/mol, 21.8 kJ/mol and $-147.7 \text{ J/K}\cdot\text{mol}^{-1}$, respectively. The less is the ΔH^* value, the more efficient was the formation of protease-protein activated complex [33]. Meanwhile, ΔS^* which represents the order and/or rigidity degree of the enzyme-substrate activated complex was negative. Such a signal of ΔS^* suggests that the enzyme-substrate complex during transition state was more ordered than in the reacting system [29,30]. ΔG^* which describes the spontaneity of the casein hydrolysis whereas the lower is ΔG^* , the more spontaneous is the reaction [33–35].

3.2.4 Kinetic parameters of proteases thermoinactivation

During the process, the denaturation progressively became more pronounced by influence of parameters such as temperature and time. Some parameters can be estimated to slow down such denaturation and increase the usefulness of enzymes during the process [36]. Then using the Eq. 10, k_d values were estimated in a temperature range from 10 to 50°C (Table 5, Fig 4). A slightly increase was observed in k_d values, which display higher effect in elevated temperatures. However, high temperatures are not desired in industrial processes, since they may confer a cooked taste in the foods. This occurrence is consistent with $t_{1/2}$ and D values, which decreased in higher temperatures (Table 5).

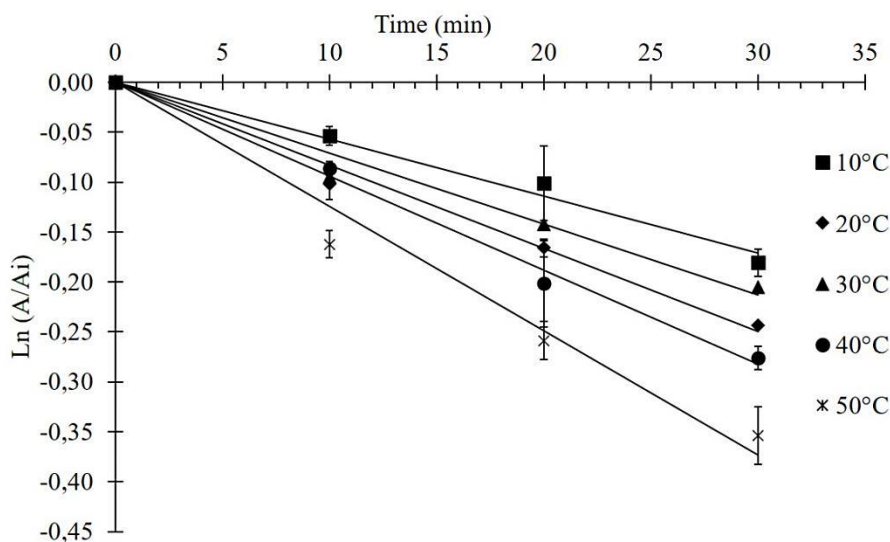


Fig.4. Semi-log plots of thermal denaturation of protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in aqueous two-phase system PEG/Citrate.

Table 5. Kinetic and thermodynamic parameters of thermoinactivation of a protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 in ATPS PEG/Citrate at different temperatures.

Temperature (°C)	k_d (min^{-1})	R^2	$t_{1/2}$ (min)	D (min)	ΔG^*_d (kJ/mol)	ΔH^*_d (kJ/mol)	ΔS^*_d (J/mol.K)
10	0.0057	0.98	121.6	404.0	91.0	27.7	-223.7
20	0.0077	0.99	90.0	299.1	93.6	27.6	-225.1
30	0.0086	0.99	80.6	267.8	96.6	27.5	-227.8
40	0.0095	0.99	72.9	242.4	99.6	27.5	-230.4
50	0.0127	0.98	54.6	181.3	102.1	27.4	-231.2

3.2.5 Thermodynamics of protease thermoinactivation

The activation energy of irreversible thermoinactivation (E_d^*) was found to be 30.0 kJ/mol. This parameter indicates how much the initial native conformation is still preserved or activated [37]. As possible to see at Table 5 ΔG_d^* values increased progressively upon heating, which suggests that ATPS offered higher thermostability [38]. When a progressive decay is observed in ΔG_d^* values the denaturation was a spontaneous process tending to a minimum value at equilibrium. Such a behavior can be also explained by ΔS_d^* values, their respective negative signals mean that the denaturation process was not spontaneous [31] and may suggest a subsequent step of denaturation [39]. Therefore, the enzymes stability is directly related to ΔG_d^* values, where high values indicate higher thermal stability. These values were very close to values reported by Castro et al. [40] who produced proteases from *A. niger* LBA02 under solid state fermentation in wheat bran (107.3 – 101.8 kJ/mol), soybean meal (98.9 – 100.7 kJ/mol), cottonseed meal (98.9 – 101.2 kJ/mol), orange peel (103.8 – 103.1 kJ/mol).

The activation enthalpy of thermoinactivation (ΔH_d^*) values suggested that approximately 5 non-covalent bonds were broken during denaturation considering 5.4 kJ/mol of energy for break a non-covalent bond [41]. It means that from 10 to 50°C the protease denaturation in ATPS still is reversible.

CONCLUSION

The extraction of a novel protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 by aqueous two-phase system (ATPS) PEG-Citrate was effective. Results obtained for satisfactory yield and purification of the proteases. The assays formed by PEG molar mass 8000 (g/mol), PEG concentration 24% (w/w), citrate concentration 15% (w/w) and pH 8.0 showed the best performance. After the biochemical characterization of the enzyme extracted by ATPS, the enzyme is an alkaline serine protease. The kinetic parameters of activation for azocasein hydrolysis revealed higher affinity. Thermodynamic parameters of protease thermo-inactivation suggested a predominating mechanism of reversible

unfolding. Results displayed the great potential of PEG-Citrate ATPS to extract the active protease from *Aspergillus heteromorphus* URM 0269, and the extracted enzyme have favorable characteristics for future industrial applications.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CNPq (National Council for Scientific and Technological Development, Brazil) (471773/2013-1), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance code: 23038.003634/2013-15), for the financial support that made this research possible.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interests.

REFERENCES

- [1] O.S. da Silva, M.H.G. Gomes, R.L. de Oliveira, A.L.F. Porto, A. Converti, T.S. Porto, Partitioning and extraction protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 using PEG-citrate aqueous two-phase systems, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 9 (2017) 168–173. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.12.012>.
- [2] S. Raveendran, A. Kuruvilla, S. Rebello, Applications of Microbial Enzymes in Food Industry, 56 (2018). <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>.
- [3] dos S. Aguiar, J. Gonçalves, H.H. Sato, Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates, *Food Res. Int.* 103 (2018) 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>.
- [4] P.M. Souza, B. Aliakbarian, E.X.F. Filho, P.O. Magalhães, A.P. Junior, A. Converti, P. Perego, Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid

- protease from *Aspergillus foetidus*, Int. J. Biol. Macromol. 81 (2015) 17–21. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.043>.
- [5] F.A. Vicente, J.H.P.M. Santos, I.M.M. Pereira, C.V.M. Gonçalves, A.C.R. V. Dias, J.A.P. Coutinho, S.P.M. Ventura, Integration of aqueous (micellar) two-phase systems on the proteins separation, BMC Chem. Eng. 1 (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s42480-019-0004-x>.
- [6] J. de C. Silva, P.R.L. de França, T.S. Porto, Optimized extraction of polygalacturonase from *Aspergillus aculeatus* URM4953 by aqueous two-phase systems PEG/Citrate, J. Mol. Liq. 263 (2018) 81–88. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.04.112>.
- [7] B.U. Rosso, C.D.A. Lima, T.S. Porto, C. De Oliveira, A. Pessoa-Junior, A. Converti, M.G. Carneiro da Cunha, A.L.F. Porto, Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly (ethylene glycol) / phosphate aqueous two-phase system, Fluid Phase Equilib. 335 (2012) 20–25. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2012.05.030>.
- [8] W.N. Phong, P.L. Show, Y.H. Chow, T.C. Ling, Recovery of biotechnological products using aqueous two phase systems, J. Biosci. Bioeng. 126 (2018) 273–281. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.03.005>.
- [9] B.M. Khan, K.-L. Cheong, Y. Liu, ATPS: “Aqueous two-phase system” as the “answer to protein separation” for protein-processing food industry, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 8398 (2018) 1–14. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1486283>.
- [10] Y.K. Yau, C.W. Ooi, E.P. Ng, J.C.W. Lan, T.C. Ling, P.L. Show, Current applications of different type of aqueous two-phase systems, Bioresour. Bioprocess. 2 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40643-015-0078-0>.
- [11] J. de C. Silva, P.R.L. de França, A. Converti, T.S. Porto, Kinetic and thermodynamic characterization of a novel *Aspergillus aculeatus* URM4953 polygalacturonase. Comparison of free and calcium alginate-immobilized enzyme, Process Biochem. 74 (2018) 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.07.010>.
- [12] T.J. Leighton, R.H. Doi, R.A.J. Warren, R.A. Kelln, The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*, J. Mol. Biol. 76 (1973) 103–122. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(73\)90083-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(73)90083-1).
- [13] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem.

72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

- [14] T.S. Porto, G.M. Medeiros e Silva, C.S. Porto, M.T.H. Cavalcanti, B.B. Neto, J.L. Lima-Filho, A. Converti, A.L.F. Porto, A. Pessoa, Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system, *Chem. Eng. Process. Process Intensif.* 47 (2008) 716–721. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.12.004>.
- [15] M. Iqbal, Y. Tao, S. Xie, Y. Zhu, D. Chen, X. Wang, L. Huang, D. Peng, A. Sattar, M.A.B. Shabbir, H.I. Hussain, S. Ahmed, Z. Yuan, Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications, *Biol. Proced. Online.* 18 (2016) 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0048-8>.
- [16] A.E. Sales, F.A.S.D. De Souza, J.A. Teixeira, T.S. Porto, A.L.F. Porto, Integrated process production and extraction of the fibrinolytic protease from *Bacillus sp.* UFPEDA 485, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170 (2013) 1676–1688. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0306-z>.
- [17] A. Salihi, A. Asoodeh, M. Aliabadian, Production and biochemical characterization of an alkaline protease from *Aspergillus oryzae* CH93, *Int. J. Biol. Macromol.* 94 (2017) 827–835. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.06.023>.
- [18] A. Abood, A.M.M. Salman, A.M. abdefattah, A.E. El-Hakim, A.M. Abdel-Aty, A.M. Hashem, Purification and characterization of a new thermophilic collagenase from *Nocardiosis dassonvillei* NRC2aza and its application in wound healing, *Int. J. Biol. Macromol.* 116 (2018) 801–810. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.030>.
- [19] S.K. Yadav, D. Bisht, S. Tiwari, N.S. Darmwal, Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant, *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4 (2015) 667–677. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.007>.
- [20] C.O. Nascimento, P.A.G. Soares, T.S. Porto, R.M.P.B. Costa, C.D.A. Lima, J.L. De Lima Filho, L.C.B.B. Coelho, M.T. Dos Santos Correia, M.D.G. Carneiro Da Cunha, A.L.F. Porto, Aqueous two-phase systems: New strategies for separation and purification of lectin from crude extract of *Cratylia mollis* seeds, *Sep. Purif. Technol.* 116 (2013) 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2013.05.012>.
- [21] R. Rodrigues, Bacterial and Fungal Proteolytic Enzymes : Production , Catalysis and Potential Applications, (2017) 1–19. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2427-2>.

- [22] M.C. de A. Wanderley, J.M.W.D. Neto, J.L. de L. Filho, C. de A. Lima, J.A.C. Teixeira, A.L.F. Porto, Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review, *Brazilian J. Microbiol.* 48 (2017) 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.08.001>.
- [23] O.S. da Silva, J. de C. Silva, E.M. de Almeida, F. Sousa, O.S.L. Gonçalves, B. Sarmiento, M.T. Neves-Petersen, T.S. Porto, Biophysical, photochemical and biochemical characterization of a protease from *Aspergillus tamaris* URM4634, *Int. J. Biol. Macromol.* 118 (2018) 1655–1666. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.004>.
- [24] S. Balaji, M. Senthil Kumar, R. Karthikeyan, R. Kumar, S. Kirubanandan, R. Sridhar, P.K. Sehgal, Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102), *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24 (2008) 2741–2745. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9782-7>.
- [25] A.P.F. Corrêa, D.J. Daroit, A. Brandelli, Characterization of a keratinase produced by *Bacillus sp.* P7 isolated from an Amazonian environment, *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 64 (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2009.06.015>.
- [26] O.S. da Silva, R.L. de Oliveira, C.M. Souza-Motta, A.L.F. Porto, T.S. Porto, Novel Protease from *Aspergillus tamaris* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation, *Adv. Enzym. Res.* 04 (2016) 125–143. <https://doi.org/10.4236/aer.2016.44012>.
- [27] T.P. Nascimento, A.E. Sales, C.S. Porto, R.M.P. Brandão, G.M. de Campos-Takaki, J.A.C. Teixeira, T.S. Porto, A.L.F. Porto, A. Converti, Purification of a fibrinolytic protease from *Mucor subtilissimus* UCP 1262 by aqueous two-phase systems (PEG/sulfate), *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1025 (2016) 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.04.046>.
- [28] J.M.W. Duarte Neto, M.C. de A. Wanderley, C. de A. Lima, A.L.F. Porto, Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*, *Protein Expr. Purif.* 147 (2018) 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2018.01.016>.
- [29] D. Michel, A probabilistic rate theory connecting kinetics to thermodynamics, *Phys. A Stat. Mech. Its Appl.* 503 (2018) 26–44. <https://doi.org/10.1016/j.physa.2018.02.188>.

- [30] O.S. da Silva, R.L. de Oliveira, J. de C. Silva, A. Converti, T.S. Porto, Thermodynamic investigation of an alkaline protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634: A comparative approach between crude extract and purified enzyme, *Int. J. Biol. Macromol.* 109 (2018) 1039–1044. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.081>.
- [31] R. Hernández-Martínez, G. Gutiérrez-Sánchez, C.W. Bergmann, O. Loera-Corral, A. Rojo-Domínguez, S. Huerta-Ochoa, C. Regalado-González, L.A. Prado-Barragán, Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*, *Process Biochem.* 46 (2011) 2001–2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.013>.
- [32] M.A. Abdel-Naby, S.A. Ahmed, H.R. Wehaidy, S.A. El-Mahdy, Catalytic, kinetic and thermodynamic properties of stabilized *Bacillus stearothermophilus* alkaline protease, *Int. J. Biol. Macromol.* 96 (2017) 265–271. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.11.094>.
- [33] M. Riaz, R. Perveen, M.R. Javed, H. Nadeem, M.H. Rashid, Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola sp.*, *Enzyme Microb. Technol.* 41 (2007) 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.010>.
- [34] Y.H. Xiong, J.Z. Liu, H.Y. Song, L.N. Ji, Purification, kinetic and thermodynamic studies of a new ribonuclease from a mutant of *Aspergillus niger*, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 348–356. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.04.008>.
- [35] M.I. Rajoka, Kinetic parameters and thermodynamic values of β -xylosidase production by *Kluyveromyces marxianus*, *Bioresour. Technol.* 98 (2007) 2212–2219. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.08.029>.
- [36] D. Fachin, A.M. Van Loey, B. Ly Nguyen, I. Verlent, A. Indrawati, M.E. Hendrickx, Inactivation kinetics of polygalacturonase in tomato juice, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4 (2003) 135–142. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00090-5).
- [37] R.B. Heidtmann, S.H. Duarte, L.P. Pereira, S.J. Kalil, Caracterização cinética e termodinâmica de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 fracionada com sulfato de amônio, *Braz. J. Food Technol.* 15 (2012) 41–49.
- [38] R.A. Alberty, Relations between biochemical thermodynamics and biochemical kinetics, *Biophys. Chem.* 124 (2006) 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.05.024>.
- [39] M. Melikoglu, C.S.K. Lin, C. Webb, Kinetic studies on the multi-enzyme solution

produced via solid state fermentation of waste bread by *Aspergillus awamori*, Biochem. Eng. J. 80 (2013) 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.09.016>.

- [40] R.J.S. de Castro, A. Ohara, T.G. Nishide, J.R.M. Albernaz, M.H. Soares, H.H. Sato, A new approach for proteases production by *Aspergillus niger* based on the kinetic and thermodynamic parameters of the enzymes obtained, Biocatal. Agric. Biotechnol. 4 (2015) 199–207. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.12.001>.
- [41] N. Ortega, S. De Diego, M. Perez-Mateos, M.D. Busto, Kinetic properties and thermal behaviour of polygalacturonase used in fruit juice clarification, Food Chem. 88 (2004) 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.01.035>.

5. CONCLUSÃO

Uma nova protease colagenolítica é produzida pelo fungo filamentosso *Aspergillus heteromorphus* URM 0269 através de fermentação em estado sólido, utilizando farelo de trigo como substrato eficientemente. A enzima imobilizada em esferas de alginato de cálcio, pela técnica de aprisionamento, apresenta atividade preservada durante o processo. Este método é bastante eficiente, pois além de manter suas propriedades, melhora significativamente sua estabilidade térmica e pH quando comparada com a enzima livre, permitindo assim a reutilização da enzima por seis ciclos e manutenção da atividade após sete dias de armazenamento.

A enzima extraída por Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) PEG-Citrato é uma serino-protease alcaliana e apresenta mais de 150% de rendimento e com fator de purificação acima de 7,0. Os parâmetros cinéticos de ativação para hidrólise da azocaseína revelaram alta afinidade da protease e os parâmetros de termoinativação enzimática sugerem um mecanismo predominante de desdobraimento reversível.

A protease imobilizada apresenta características bioquímicas compatíveis para a aplicação em diversos processos industriais que ofereçam condições desfavoráveis para as enzimas livres, como também, características específicas que permitirão novas aplicações nas indústrias de detergentes, cosméticos, processamento de carnes, couro e diversos processos biotecnológicos.