



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

CAROLINA WINGETER MERHEB

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE AÇÃO DE PROTEASE DO FUNGO
TERMOFÍLICO *THERMOASCUS AURANTIACUS***

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

São José do Rio Preto

2007

**PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE AÇÃO DE PROTEASE DO FUNGO
TERMOFÍLICO *THERMOASCUS AURANTIACUS***

CAROLINA WINGETER MERHEB

Orientador: Prof. Dr. Roberto da Silva

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio
Preto, como requisito para obtenção do título
de **Mestre em Engenharia de Alimentos**
(Área de concentração **Ciência e Tecnologia
de Alimentos**).

São José do Rio Preto, SP

Fevereiro/2007

Merheb, Carolina Wingeter.

Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* / Carolina Wingeter Merheb. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2007.
98 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Roberto da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Enzimas de fungos. 2. *Thermoascus aurantiacus*. 3. Protease – Purificação. 4. Protease – Caracterização bioquímica.
I. Silva, Roberto da. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.15

UNESP-UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS (ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS)

Esta é a versão final da dissertação de Mestrado “Produção, purificação, caracterização bioquímica e determinação do padrão de ação de protease do fungo termofílico *Thermoascus Aurantiacus*” apresentada por Carolina Wingeter Merheb perante a banca examinadora em 23 de fevereiro de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto da Silva

Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Orientador)

Prof. Dr. Luiz Juliano

Universidade Federal de São Paulo-SP
(Titular)

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna

Universidade Estadual Paulista-Campus de São José do Rio Preto-SP
(Titular)

*Aos meus pais, Ney e Lisete,
pelo apoio, dedicação e,
principalmente, pelo amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Roberto da Silva, pela amizade e confiança durante a orientação deste trabalho;

À FAPESP, pelo auxílio financeiro (processo número 04/11962-9);

À Prof^a. Eleni Gomes e aos colegas de laboratório, Alexandre, Aline, Ana Flávia, Ana Paula, Andréia, Dênis, Denise, Eduardo, Ellen, Érica, Fabiana, Gisele, Heloiza, Lílian, Luis Gustavo, Marcelo, Maíra, Natália, Patrícia, Paula, Roberto, Rodolfo, Rodrigo, Rosângela, pelas trocas de idéias e momentos agradáveis;

Às amigas e companheiras de república, Ellen Lago e Thaís de S. Rocha, com quem compartilhei alegrias, frustrações e vitórias;

Ao amigo Hamilton Cabral, pela amizade, pelas dicas e por estar sempre disposto a ajudar;

Aos professores da banca do Exame de Qualificação, Prof. Hamilton Cabral e Prof^a. Ana Lúcia Barretto Penna, pelas sugestões ao trabalho;

Aos professores da banca de defesa do Mestrado, pela contribuição ao trabalho;

Ao meu irmão, Eduardo, por estar sempre presente em todos os momentos e novas etapas da minha vida;

À minha família, pela torcida e reconhecimento;

Ao meu namorado e futuro marido, David, pelo incentivo, força, companheirismo, amizade e acima de tudo pelo grande amor;

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte as amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.”

Mark Twain

RESUMO

Proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, sendo o setor alimentício um dos que mais as utilizam, pois atuam sobre proteínas. Este trabalho teve como objetivo produzir, purificar e caracterizar a protease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*. A produção foi em fermentação em estado sólido e o extrato enzimático bruto foi caracterizado. A atividade de protease, no extrato enzimático bruto, foi inibida por ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (60,61%) e por fluoreto fenimetilsulfonil (PMSF) (56,37%) e foi levemente estimulada por Ca^{2+} . Seu padrão de ação hidrolítico sobre a caseína foi estudado por UREA-PAGE, mostrando diferença significativa em relação a uma renina microbiana recombinante. O extrato enzimático bruto foi purificado através de precipitação com álcool a 72% seguido de cromatografias em resinas Sephadex G75 e Sephacryl S100. Apresentou rendimento de 0,4% e um fator de purificação de 80 vezes. A massa molecular de 24,5 KDa foi estimada por SDS-PAGE. A protease pura apresentou inibição somente por EDTA (96,70%) e ativação por sulfato ferroso, revelando-se uma metaloprotease ativada por ferro. O pH ótimo foi 5,5; a temperatura ótima foi 75°C e foi termoestável a 65°C por 1 hora restando mais de 70% de atividade original. Apresentou aumento de 151,0% de atividade na presença de Tween-20 e, através dos estudos de cinética enzimática, hidrolisou melhor a caseína do que a azocaseína.

Palavras-chave: *Thermoascus aurantiacus*. FES. Farelo de trigo. Caseína. Metaloprotease. Termoestabilidade.

ABSTRACT

Proteases are a very important group of industrial enzymes, and are most employed in the food segment due to their action on proteins. This work had the aim to produce, purify and characterize the protease from the thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. The production was carried out in solid state fermentation and the crude enzymatic extract was characterized. The proteolytic activity, in the crude extract, was inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (60.61%) and by phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (56.37%) and was slightly stimulated by Ca^{2+} . Its hydrolytic action profile on casein was studied by UREA-PAGE, showing significant difference when compared to a recombinant microbial rennet. The crude enzymatic extract was purified through precipitation with ethanol at 72% followed by chromatographies in columns of Sephadex G75 and Sephacryl S100. It was purified 80-fold and exhibited recovery of total activity of 0.4%. SDS-PAGE analysis indicated an estimated molecular mass of 24.5 KDa. The purified protease was only inhibited by EDTA (96.70%) and stimulated by Fe^{2+} revealing to be a metalloprotease activated by iron. The optimum pH was 5.5, optimum temperature was 75°C and it was thermostable at 65°C for 1 hour maintaining more than 70% of original activity. It showed increase of 151.0% in activity in the presence of Tween-20 and, through enzyme kinetics studies, better hydrolyzed casein than azocasein.

Keywords: *Thermoascus aurantiacus*. SSF. Wheat bran. Casein. Metalloprotease. Thermostability.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em três capítulos, os quais serão submetidos à publicação.

Um resumo e uma introdução geral foram introduzidos para mostrar ao leitor a importância do trabalho científico.

O Capítulo I corresponde a uma revisão bibliográfica destacando a importância e principais aplicações das proteases; os microrganismos produtores, principalmente os fungos; os processos fermentativos; uma descrição dos critérios utilizados para sua classificação e finalmente alguns relatos sobre purificação de proteases fúngicas.

O Capítulo II (“Produção e caracterização de protease do extrato enzimático bruto do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*”) apresenta os resultados obtidos dos estudos de produção e caracterização da protease, no extrato enzimático bruto, do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*. Alguns desses resultados já foram publicados (Merheb, C. W. et al. Partial characterization of protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* and its hydrolytic activity on bovine casein, *Food Chemistry* (2006), doi: 10.1016/j.foodchem.2006.11.010.). O artigo encontra-se em anexo.

O Capítulo III (“Purificação e caracterização da metaloprotease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*”) apresenta os resultados da purificação e caracterização da protease pura.

Em seguida, foi apresentada uma conclusão geral do trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - A micela de caseína 24
- Figura 2** - Agentes proteolíticos responsáveis pela maturação de queijos.....26

Capítulo 2

- Figura 1** - Produção de protease por *T. aurantiacus*.....48
- Figura 2** - Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica50
- Figura 3** - Efeito da temperatura no tempo de coagulação do leite por ação da protease no extrato enzimático bruto52
- Figura 4** - Efeito do CaCl_2 na atividade coagulante54
- Figura 5** - Variação de absorbância, que correlaciona com atividade proteolítica, com o tempo de incubação da caseína.55
- Figura 6** - URÉIA-PAGE da hidrólise da caseína pela protease-TA.....56
- Figura 7** - URÉIA -PAGE da hidrólise da caseína pelo coalho56

Capítulo 3

- Figura 1** - **A** - Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephadex G75. **B** - Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% das frações coletadas após filtração em gel na resina Sephadex G75.....74
- Figura 2** - Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephacryl S10074
- Figura 3** - Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% da protease de *T. aurantiacus* após a purificação75
- Figura 4** - Curva padrão para determinação da massa molecular da protease através dos valores de cada massa molecular das proteínas do marcador e de R_f , onde R_f = distância percorrida por cada proteína do marcador / distancia total de corrida, obtidos de SDS-PAGE 15% (não mostrado).....76

Figura 5 - Efeito do pH na atividade da protease	78
Figura 6 - Efeito da temperatura na atividade da protease.....	79
Figura 7 - Efeito da temperatura na desnaturação da protease.....	80
Figura 8 - Efeito da temperatura na estabilidade da protease	81
Figura 9 - Efeito da concentração de NaCl na atividade da protease	82
Figura 10 - Efeito da concentração de detergentes na atividade da protease.....	83
Figura 11 - Efeito da concentração de sulfato ferroso na atividade da protease	85
Figura 12 - Efeito da concentração de caseína na velocidade de reação: curva de Michaelis-Menten, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$	87
Figura 13 - Efeito da concentração de azocaseína na velocidade de reação: curva de Michaelis-Menten, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$	87
Figura 14 - Efeito da concentração de azocaseína na velocidade de reação: duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$	89
Figura 15 - Efeito da concentração de caseína na velocidade de reação: duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$	89

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 -	Efeito de sais na atividade proteolítica do extrato enzimático precipitado.....	51
Tabela 2 -	Efeito de inibidores de protease (10 mM) na atividade proteolítica do extrato enzimático precipitado.....	51
Tabela 3 -	Ensaio enzimático da protease do extrato enzimático bruto de <i>T. aurantiacus</i> e do coalho comercial, a 45°C.....	53

Capítulo 3

Tabela 1 -	Precipitação alcoólica de protease de <i>T. aurantiacus</i> de meio de fermentação composto por farelo de trigo com 5% de caseína	73
Tabela 2 -	Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da protease do extrato enzimático de <i>T. aurantiacus</i>	76
Tabela 3 -	Efeito de sais (10 mM) na atividade da protease.....	84
Tabela 4 -	Efeito de inibidores de protease (10 mM) na atividade da protease.....	86
Tabela 5 -	Parâmetros cinéticos da protease utilizando caseína e azocaseína como substratos	88
Tabela 6 -	Parâmetros cinéticos da protease utilizando caseína e azocaseína como substratos	90

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA – albumina de soro bovino

PMSF – fluoreto fenilmetilfulfonil

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

UREA-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia

TCA – ácido tricloroacético

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio

DTT – ditioneitol

E-64 – *trans*-epoxisuccinil-L-leucilamida –(4-guanidino)-butano

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	17
I.1 Proteases	18
I.1.1 Aplicação das proteases	19
I.1.1.1 <i>Higiene e sanitização</i>	19
I.1.1.2 <i>Detergentes</i>	19
I.1.1.3 <i>Indústria alimentícia</i>	20
I.1.1.3.1 <i>Panificação</i>	20
I.1.1.3.2 <i>Carnes</i>	20
I.1.1.3.3 <i>Cervejaria</i>	21
I.1.1.3.4 <i>Hidrólise enzimática: modificação das propriedades nutricionais e funcionais das proteínas alimentares</i>	21
I.1.2.3.5 <i>Laticínios - fabricação de queijos</i>	24
I.1.2 Proteases fúngicas	28
I.1.3 Fermentação	29
I.1.4 Propriedades catalíticas de Proteases	32
I.1.5 Purificação de enzimas	32
I.2 Referências Bibliográficas	34
CAPÍTULO II - PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO DO FUNGO TERMOFÍLICO <i>Thermoascus aurantiacus</i>	41
Resumo	42
II.1 Introdução	42
II.2 Materiais e Métodos	43
II.2.1 Microrganismo	43
II.2.2 Inóculo	43
II.2.3 Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática	44
II.2.4 Determinação da atividade proteolítica	44
II.2.5 Determinação da atividade coagulante no leite	45
II.2.6 Caracterização da protease no extrato enzimático bruto obtido de FTC	45

II.2.6.1	<i>Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica</i>	45
II.2.6.2	<i>Efeito de sais e inibidores de protease na atividade proteolítica</i>	46
II.2.6.3	<i>Estudo comparativo dos ensaios enzimáticos: protease x coalho comercial</i> ..	46
II.2.6.4	<i>Efeito da concentração de CaCl₂ na coagulação do leite</i>	47
II.2.6.5	<i>Estudo do padrão de ação da protease</i>	47
II.2.6.5.1	<i>Monitoramento de atividade proteolítica</i>	47
II.2.6.5.2	<i>Monitoramento da degradação da caseína do leite</i>	47
	A) <i>Hidrólise enzimática do leite</i>	47
	B) <i>Eletroforese</i>	48
II.3	Resultados e Discussão	48
II.3.1	Produção da enzima	48
II.3.2	Caracterização da protease no extrato enzimático bruto.....	50
II.3.2.1	<i>Efeito da Temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica</i>	50
II.3.2.2	<i>Efeito de sais e inibidores de protease na atividade proteolítica</i>	51
II.3.2.3	<i>Estudo comparativo dos ensaios enzimáticos: protease x coalho comercial</i> ..	53
II.3.2.4	<i>Efeito da Concentração de CaCl₂ na coagulação do leite</i>	54
II.3.2.5	<i>Estudo do padrão de ação da protease</i>	55
II.3.2.5.1	<i>Monitoramento de atividade proteolítica</i>	55
II.3.2.5.2	<i>Monitoramento da degradação da caseína do leite</i>	56
II.4	Conclusões	59
II.5	Referências Bibliográficas	60
CAPÍTULO III - PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA METALOPROTEASE DO FUNGO TERMOFÍLICO <i>Thermoascus aurantiacus</i>		65
	Resumo.....	66
III.1	Introdução	66
III.2	Materiais e Métodos	67
III.2.1	Microrganismo.....	67
III.2.2	Inóculo.....	67
III.2.3	Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática	68
III.2.4	Determinação da atividade proteolítica.....	68
III.2.5	Determinação de proteína.....	69
III.2.6	Purificação da protease	69

III.2.7	Elektroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	70
III.2.8	Caracterização da enzima pura.....	70
III.2.8.1	<i>Determinação de pH e temperatura ótimos</i>	71
III.2.8.2	<i>Estabilidade térmica</i>	71
III.2.8.3	<i>Efeito do NaCl na atividade proteolítica</i>	71
III.2.8.4	<i>Efeito de detergentes na atividade proteolítica</i>	72
III.2.8.5	<i>Efeito de sais na atividade proteolítica</i>	72
III.2.8.6	<i>Efeito de inibidores na atividade proteolítica</i>	72
III.2.8.7	<i>Cinética enzimática</i>	73
III.3	Resultados e Discussão	73
III.3.1	Purificação de uma protease a partir do extrato enzimático bruto.....	73
III.3.2	Caracterização da enzima pura.....	78
III.3.2.1	<i>Determinação de pH e temperatura ótimos</i>	78
III.3.2.2	<i>Estabilidade térmica</i>	81
III.3.2.3	<i>Efeito do NaCl na atividade proteolítica</i>	83
III.3.2.4	<i>Efeito de detergentes na atividade proteolítica</i>	83
III.3.2.5	<i>Efeito de sais na atividade proteolítica</i>	85
III.3.2.6	<i>Efeito de inibidores na atividade proteolítica</i>	86
III.3.2.7	<i>Cinética enzimática</i>	87
III.4	Conclusões	92
III.5	Referências Bibliográficas	93
	CONCLUSÃO	98

INTRODUÇÃO

A importância das enzimas na tecnologia de alimentos já é conhecida de longa data. Em especial, as proteases são de grande interesse. Sua ação provoca a degradação de proteínas pela hidrólise das ligações peptídicas e esta reação é importante na preparação de uma grande variedade de produtos alimentícios processados como, por exemplo, queijos, cervejas, amaciamento de carne e panificação. Estas proteases podem já estar presentes na matéria prima do alimento; podem ser excretadas por microrganismos crescendo no alimento ou podem ser adicionadas como preparações enzimáticas isoladas. Assim, as proteases, como biocatalizadores, promovem muitas reações químicas e são comercialmente exploradas nas indústrias de alimentos, farmacêutica e química.

O interesse científico em proteases e suas ações em diferentes proteínas dos alimentos não somente podem resultar em melhores produtos, mas também estimulam o desenvolvimento de um grande número de novas aplicações para as proteases na produção de alimentos e seus ingredientes. Esse desenvolvimento também se tornou possível pelo aumento da disponibilidade de proteases de origens microbianas comerciais com propriedades adequadas para o uso na indústria alimentícia.

Conhecendo a importância de proteases na indústria de alimentos, as informações sobre as características da enzima mostram-se interessantes não apenas do ponto de vista da pesquisa básica, mas também como parâmetros relevantes visando seu emprego na pesquisa aplicada.

Neste trabalho serão apresentados estudos de produção de uma protease fúngica através de um processo fermentativo; estudos para investigar o modo de ação desta protease sobre a caseína, importante proteína da indústria alimentícia e, após purificação, a caracterização bioquímica em relação às condições ótimas para sua atuação.

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

Revisão de Literatura

I.1 Proteases

Enzimas vêm sendo utilizadas para auxiliar processamentos em diversas indústrias alimentícias há muito tempo (AFAF et al., 2004). Com a função básica de hidrolisar proteínas, as proteases são usadas comercialmente para promover esta hidrólise em alguns alimentos (CAPIRALLA et al., 2002). As proteases são enzimas hidrolíticas, com diferentes características proteolíticas e diferentes graus de especificidade. Por exemplo, a quimosina (EC 3.4.23.4), protease coagulante obtida do estômago de bezerros, possui baixa atividade proteolítica generalizada e alta especificidade para a caseína atuando no sítio de hidrólise entre os resíduos de aminoácidos fenilalanina, localizado na posição 105 da cadeia, e metionina, localizado na posição 106, o que a torna adequada para produção de queijos (RAO et al., 1998; KUMAR et al., 2005).

As proteases são amplamente usadas no processamento de alimentos e em muitos outros setores industriais. Muitos produtos alimentícios consumidos diariamente, entre os quais o pão e o queijo, são produzidos com a colaboração deste tipo especial de enzima. Também se empregam em outras atividades, como na indústria de produtos de limpeza, principalmente os detergentes; em preparação têxtil (tratamento enzimático de couro) e em aplicações médicas (GUPTA et al., 2002).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR et al., 2005) e as de origem microbiana estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e têm sido estudadas extensivamente (GUPTA et al., 2002).

As proteases são classificadas de acordo com sua fonte (animal, vegetal, microbiológica), sua ação catalítica (exopeptidases e endopeptidases) ou de acordo com a natureza do seu sítio catalítico (serino, cisteíno, aspárticas e metalo) (RAO et al., 1998).

I.1.1 Aplicação das proteases

I.1.1.1 Higiene e sanitização

Proteases alcalinas são utilizadas no manuseio de resíduos tanto de indústrias de processamento de alimentos como, por exemplo, penas de aves nos frigoríficos, quanto de atividades caseiras, onde se verifica a existência de uma fórmula contendo enzimas proteolíticas que desentope encanamentos obstruídos por cabelos (GUPTA et al., 2002).

De acordo com Turner et al., (2005), um pré-requisito para a produção de alimentos seguros e de boa qualidade é a implementação de processos rigorosos de higiene, principalmente nas etapas onde o produto entra em contato direto com superfícies de equipamentos. Resíduos a base de proteína geralmente são os piores, principalmente em indústrias de laticínios e de carnes. A remoção destes resíduos inclui uso de álcalis e/ou lavagens com detergentes ácidos, sanitização química ou através de calor e um enxágüe final. O uso de álcalis ou ácidos aumentam custos, reduzem a vida útil do equipamento e representa um perigo aos manipuladores durante o processamento e ao ambiente. Assim, enzimas proteolíticas podem ser utilizadas, oferecendo vantagens ao processo de higienização, removendo resíduos protéicos. Mostrou-se, no trabalho de Turner et al. (2005), que um preparado proteolítico comercial chamado 'Alcalase' removeu quantidades significativas de resíduos protéicos (caseína, BSA e hemoglobina) depositadas sobre superfície de vidro e que a atividade enzimática residual após a limpeza poderia ser facilmente inativada.

I.1.1.2 Detergentes

Proteases microbianas alcalinas são muito empregadas em formulações de detergentes, pois possibilitam a remoção de manchas e resíduos protéicos, provenientes, por exemplo, de carne, sangue, leite e ovo e por serem aceitas ecologicamente (KUMAR; TAKAGI, 1999). O ideal é que estas proteases possuam alta atividade e estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, que sejam efetivas em baixas concentrações (0,4 – 0,8%), que sejam compatíveis com os outros componentes do detergente, como agentes oxidantes, surfactantes e que tenham

uma longa vida de prateleira (KUMAR; TAKAGI, 1999; MOREIRA et al., 2002; NASCIMENTO; MARTINS, 2006). Entretanto algumas aplicações são menos exigentes que outras. Por exemplo, para soluções de limpeza de lentes de contato, não há necessidade de que a enzima seja termoestável.

Geralmente estas proteases são obtidas por bactérias do gênero *Bacillus* como as encontradas mais recentemente nos trabalhos de Nascimento; Martins (2006); El Hadj-Ali et al. (2006); Johnvesly; Naik (2001); Sellami-Kamoun et al. (2006).

I.1.1.3 Indústria alimentícia

I.1.1.3.1 Panificação

A farinha de trigo é o principal componente dos processos de panificação e contém uma proteína insolúvel chamada glúten, que determina as propriedades das massas. Endo e exoproteinasas de *Aspergillus oryzae* têm sido usadas para modificar o glúten através de proteólise limitada. O tratamento enzimático da massa facilita seu manuseio e permite a produção de uma ampla variedade de produtos. A adição de proteases reduz o tempo de mistura e resulta em pães com volumes maiores (RAO et al., 1998).

De acordo com Schmidell et al. (2001) (b), especificamente para *crackers*, utiliza-se proteases de origem fúngica e bacteriana. Elas conferem à massa força e extensibilidade adequadas, permitindo uma laminação isenta de fraturas, e de espessura conveniente para a correta tostagem do material durante o forneamento.

I.1.1.3.2 Carnes

Um grande número de enzimas proteolíticas produzidas por plantas, como papaína e bromelina (AFAF et al., 2004), animais e microrganismos se mostraram eficientes amaciadores de carne. São empregadas com este fim as proteases alcalinas termofílicas, que possuem a habilidade de hidrolisar proteínas do tecido conjuntivo e também proteínas da fibra

muscular. O processo de amaciamento se dá através do polvilhamento de uma preparação enzimática ou através da imersão do produto em uma solução enzimática e/ou injetando a preparação concentrada de protease na própria carne do animal (KUMAR & TAKAGI, 1999).

I.1.1.3.3 Cervejaria

Na indústria cervejeira, existe o problema da formação de turbidez, que surge pela proliferação de microrganismos (turbidez biológica) ou como resultado de reações químicas entre substâncias da cerveja (turbidez não biológica). A turbidez não biológica é resultado da combinação de polipeptídios com taninos na cerveja, devido ao resfriamento, produzindo partículas facilmente visíveis. Enzimas proteolíticas são usadas na prevenção deste tipo de turbidez: como a molécula de proteína é consideravelmente maior do que a do componente tanino, é o seu tamanho que determina o tamanho do agregado final. Conseqüentemente, reduzindo o tamanho do polipeptídio com preparações enzimáticas adequadas, o problema da turbidez será resolvido. As enzimas papaína, pepsina, ficina, bromelina e proteases microbianas combinadas entre si aparentam ser a melhor preparação enzimática (ESKIN; HENDERSON & TOWNSEND, 1971). As enzimas são utilizadas durante as seguintes etapas do processamento da cerveja: malteação, fermentação e maturação, auxiliando no controle da turbidez (SCHMIDELL et al., 2001) (b).

I.1.1.3.4 Hidrólise enzimática: modificação das propriedades nutricionais e funcionais das proteínas alimentares

Hidrolisados protéicos podem ser classificados de acordo com o grau de hidrólise, o qual determina suas aplicações: hidrolisados com baixo grau de hidrólise, com melhores propriedades funcionais; e hidrolisados com extenso grau de hidrólise que são empregados como suplementos nutricionais e em dietas medicinais especiais sendo os principais constituintes de produtos geriátricos, suplementos de alto valor energético e alimentos hipoalergênicos (PEDROCHE et al., 2004). Essa importância é devido ao fato de que os hidrolisados, compostos por peptídeos pequenos, apresentam a vantagem de serem absorvidos

mais eficientemente e possuem um maior valor nutritivo do que as proteínas intactas ou do que uma mistura equivalente de aminoácidos livres (CLEMENTE, 2000; MORATO et al., 2000). Assim, os hidrolisados protéicos contendo aminoácidos livres e peptídeos pequenos, constituem uma alternativa às proteínas intactas e estão presentes em formulações especiais desenvolvidas para fornecer suporte nutritivo a pacientes com diferentes necessidades.

A hidrólise enzimática aparenta ser o método mais apropriado para a obtenção de peptídeos devido à disponibilidade comercial em grande escala, custo moderado, possibilidade de controlar a hidrólise e consequentemente as propriedades dos produtos gerados e pela alta qualidade desses produtos (CLEMENTE, 2000). Uma proteólise limitada pode melhorar as propriedades funcionais de proteínas através da mudança de seu tamanho molecular, conformação, força de ligações inter- e intramoleculares (GUAN et al., 2007)

As enzimas proteolíticas possuem habilidades hidrolíticas variadas. Assim, a seleção de enzimas para obtenção de compostos com características físico-químicas definidas é essencial. Para isso, uma reação sequencial executada por endopeptidases e exopeptidases é preferida, pois uma facilita a ação da outra e com isso é possível alcançar uma degradação mais completa (CLEMENTE, 2000).

Um exemplo da aplicação médica de hidrolisados protéicos são os que contém peptídeos com alta razão entre aminoácidos com cadeias ramificadas e aminoácidos aromáticos, conhecido como razão de Fischer, e cujo conteúdo de tirosina e fenilalanina não exceda 2% do total dos aminoácidos, são utilizados em dietas específicas para pacientes com encefalopatia hepática (mal funcionamento do fígado que ocasiona doenças cerebrais) e fenilcetonúria (PEDROCHE et al., 2004). Essa composição específica dos hidrolisados foi alcançada no trabalho de Pedroche et al. (2004) através de uma pré digestão de caseína, proteína de alto valor nutricional, com tripsina, seguido de tratamento com quimotripsina, que gerou um hidrolisado rico em peptídeos com aminoácidos aromáticos na extremidade carboxi terminal, e finalmente tratamento com carboxipeptidase A, que removeu esses aminoácidos aromáticos.

Hidrolisados protéicos de soro de leite

Soro de leite é um resíduo obtido após a fabricação de queijo em laticínios, que contém proteínas de alto valor nutricional devido ao conteúdo de aminoácidos essenciais além de aminoácidos contendo enxofre, como a cisteína, os quais possuem funções antioxidante (SINHA et al., 2007). De acordo com Mota et al. (2006), a β -Lactoglobulina, uma das

principais proteínas do soro, é responsável pela maioria das propriedades bioativas de produtos fabricados a partir de soro. Os hidrolisados dessas proteínas, obtidos enzimaticamente, podem ser adicionados a alimentos especiais para agregar valor, já que hidrólises enzimáticas originam peptídeos que aumentam as propriedades nutricionais de digestibilidade e bioatividade. Além dessas propriedades, os hidrolisados desempenham função de agentes gelificantes, emulsificantes ou espumantes, dependendo da natureza do peptídeo e do grau da hidrólise (SINHA et al., 2007).

No trabalho de Sinha et al. (2007) foi estudada a hidrólise de concentrado protéico de soro (CPS) por ação de papaína e de uma protease fúngica. Percebeu-se, numa cromatografia de filtração em gel, que houve uma diminuição progressiva do número de picos de proteína conforme aumentou-se o tempo de tratamento enzimático, principalmente na amostra tratada com papaína, o que significa que o CPS foi hidrolisado.

Hidrolisados protéicos de farelo de aveia

Preparações de proteína de aveia possuem boas qualidades nutricionais, porém em pH levemente ácido ou alcalino que são adequados para os sistemas de alimentação, suas propriedades funcionais não são aproveitadas. Isso é um fator limitante para o consumo de proteínas de aveia tornando necessário o melhoramento de suas propriedades funcionais (GUAN et al., 2007). Mostrou-se no trabalho de Guan et al. (2007) que a hidrólise de concentrado protéico de farelo de aveia por tripsina melhorou suas propriedades funcionais como solubilidade, capacidade de retenção de água, atividade emulsificante e habilidade espumante.

Remoção de gosto amargo

Um aspecto negativo proveniente da hidrólise protéica é a formação de gosto amargo, devido à liberação de peptídeos pequenos contendo resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Proteínas intactas não apresentam gosto amargo porque seu tamanho molecular afeta sua habilidade de interagir com receptores de amargor na cavidade oral (FITZGERALD; GUINN, 2006).

De acordo com a revisão feita por Fitzgerald; Guinn (2006), peptídeos menores que 6 KDa contendo resíduos de leucina, prolina, fenilalanina, tirosina, isoleucina e triptofano provavelmente serão amargos e ainda que quando situados no interior da molécula provocarão

amargor mais intenso do que quando situados nas extremidade N- ou C-terminais. Muita atenção tem sido dada ao uso de exo e endopeptidases para remover gosto amargo, principalmente as que hidrolisam ligações adjacentes aos resíduos hidrofóbicos, em especial a prolina, mostrando que a especificidade é um fator importante para escolher a estratégia enzimática para remoção de gosto amargo.

I.1.2.3.5 Laticínios - fabricação de queijos

Esta é provavelmente, a área de maior volume de aplicação das proteases na indústria de alimentos.

O leite é uma emulsão de gorduras em água estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína. As proteínas do leite podem ser classificadas em quatro grupos, de acordo com suas propriedades físico-químicas e estruturais: 1) caseínas; 2) proteínas do soro; 3) proteínas das membranas dos glóbulos de gordura; 4) enzimas (SGARBIERI, 2005), como as proteases Plasmina e Catepsina D.

As caseínas são fosfoproteínas globulares insolúveis em pH 4,6 e a 20°C e existem no leite na forma micelar. A micela é uma complexa formação de várias unidades de caseínas, as quais são compostas por cadeias de amino ácidos. Podem ser subdivididas nas seguintes classes: α - (α_{s1} e α_{s2}), β -, γ - e κ -caseínas, sendo que a γ -caseína resulta da proteólise da β -caseína. Uma unidade inteira de caseína é composta por, aproximadamente, 40% α -caseínas, 35% β -caseínas, 15% κ -caseínas e 10% de compostos inorgânicos, principalmente fosfato de cálcio coloidal (ROBINSON; WILBEY, 1998).

As frações α_{s1} contêm de sete a nove resíduos fosfato-serina por mol, a α_{s2} de 10 a 13 e a β cinco. Estes resíduos são concentrados em *clusters* (grupos) e são responsáveis pela existência de áreas hidrofílicas com forte carga negativa. Devido à presença de fósforo (P) nas frações α_{s1} , α_{s2} e β , elas se ligam fortemente ao cálcio e precipitam na presença de íons $[Ca^{2+}] > 6$ mM. Entretanto, a κ -caseína, que possui apenas um resíduo fosfato por mol, é solúvel em altas $[Ca^{2+}]$. Ela interage hidrofobicamente com as frações α e β e consegue estabilizá-las contra a precipitação (LAW, 1997).

A fração κ difere da α e β por conter apenas um grupo fosfato-serina e por uma de suas metades conter um oligossacarídeo. Sua molécula aparenta ser constituída de uma

estrutura, relativamente estável, com uma única ponte dissulfeto dentre a qual estão ambas α -hélice e folhas β (estruturas secundárias). A ligação Phe₁₀₅ – Met₁₀₆, sensível à renina, projeta-se a partir da superfície molecular. Um terço da molécula é representada pela seção carboxiterminal fortemente iônica, que contém resíduos de aminoácidos ácidos e a maioria dos hidrofílicos, além dos três resíduos oligossacarídeos. O restante da molécula, representada pela região aminoterminal, que agrupa os aminoácidos básicos e os apolares, é altamente hidrofóbica e corresponde à *para*- κ -caseína formada após a hidrólise da ligação Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ (SGARBIERI, 2005).

A natureza anfipática das caseínas e suas fosforilações facilitam as interações umas com as outras e com fosfato de cálcio, e possuem diferentes tamanhos, com o diâmetro variando de 30 a 300 nm. Vários modelos têm sido sugeridos para a micela e um dos mais conhecidos está representado na Figura 1.

Consiste de um agregado de sub-micelas quase esféricas, as quais consistem de agregados mais limitados de moléculas (frações) de caseína. O fosfato de cálcio e as α - e β -caseínas são unidos pelo envolvimento dos resíduos fosfato-serina na estrutura do fosfato de cálcio. A κ -caseína está localizada na superfície da micela, ou então muito próximo à superfície. A parte hidrofóbica da molécula da κ -caseína é atada ao núcleo da micela, enquanto que o glicomacropéptideo hidrofílico forma uma camada de filamentos altamente hidratados, que se projetam para a fase aquosa. Esses filamentos são responsáveis pela estabilização estérica das micelas de caseína (VARNAM; SUTHERLAND, 2001).

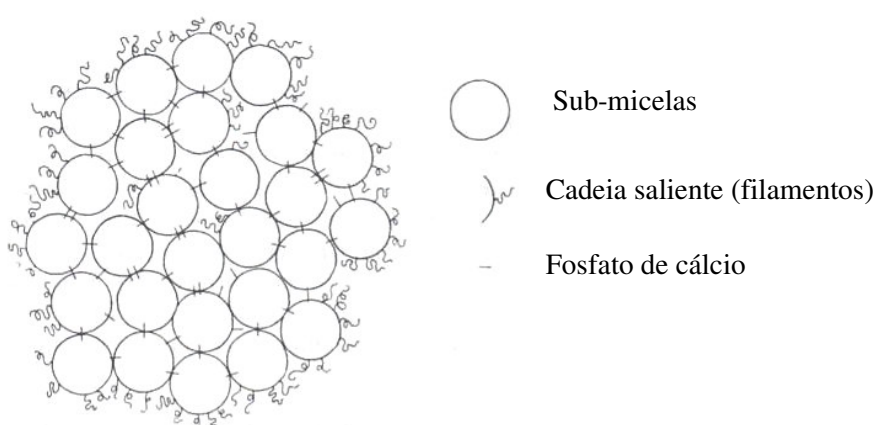


Figura 1. A micela de caseína.

Fonte: VARNAM; SUTHERLAND, 2001.

Mais recentemente foi proposto por Dalglish; Spagnuolo; Goff (2004), de acordo com micrografias obtidas de microscópio eletrônico de varredura, que a superfície da micela é, na verdade, mais complexa e flexível do que apenas filamentos atados a uma esfera, e consiste de pequenos tubos de caseína que se projetam a partir da massa interior, e na extremidade desses tubos é que se situa a κ -caseína, o que implica em maior área superficial, e ainda que parece existir entradas ou fendas, sugerindo que o interior da micela é acessível à pequenas moléculas como as enzimas.

a) Coagulação do leite

O primeiro passo da fabricação de queijos envolve a coagulação das caseínas por enzimas proteolíticas coagulantes. Uma importante característica da κ -caseína na fabricação de queijos é que a renina é capaz de partir a cadeia de amino ácidos especificamente entre as unidades 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). As duas partes resultantes desta divisão são a para- κ -caseína insolúvel (resíduos de amino ácidos de 1 a 105) que permanece associada à micela de caseína e um peptídeo solúvel (glicomacropéptídeo; resíduos 106 a 148) (ROBINSON; WILBEY, 1998). A para- κ -caseína não estabiliza a estrutura micelar e as frações alfa e beta precipitam, na presença de cálcio, formando o coágulo, que expulsa o soro por sinérese (NAGODAWITHANA; REED, 1993). O cálcio ajuda na coagulação por criar condições isoeletricas e por agir como uma ponte entre as micelas. O efeito deste íon é de grande importância na segunda fase, não enzimática, da coagulação do leite que ocorre quando quantidades suficientes de κ -caseína foram hidrolisadas e se a temperatura e a atividade do íon forem suficientemente altas (ANEMA; LEE; KLOSTERMEYER, 2005).

A renina, tradicionalmente obtida do 4º estômago de bezerro, é a principal enzima utilizada na produção de queijos (KUMAR et al., 2005) e participa tanto da coagulação do leite quanto da maturação do queijo, processo importante para o desenvolvimento de sabor e textura (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

b) Maturação do queijo

Enzimas coagulantes também possuem habilidades proteolíticas que contribuem para a maturação do queijo. Os principais agentes responsáveis pela proteólise durante a maturação são: enzimas endógenas do leite, ou seja, naturalmente presentes (ex. plasmina); coagulante residual retido no coágulo após a produção (ex. renina, pepsina, proteinases microbianas ou de plantas); enzimas proteolíticas provenientes das culturas lácticas (fermento) e da flora

secundária/contaminante ou ainda proteinases/peptidases exógenas (TRUJILLO et al., 2000; WILKINSON; KILCAWLEY, 2005). A renina é a menos proteolítica dos coagulantes normalmente utilizados (NAGODAWITHANA; REED, 1993).

A atuação destes agentes proteolíticos, durante a maturação, pode ser observada na Figura 2.

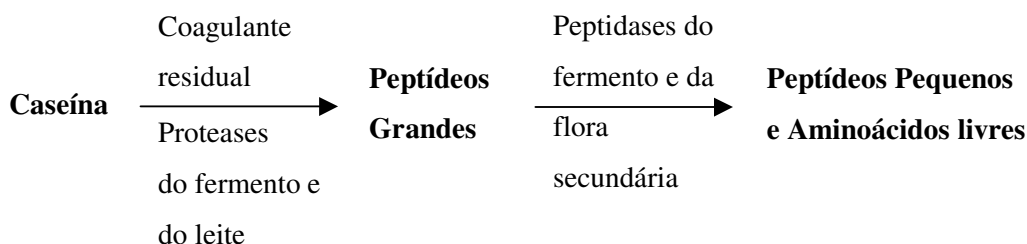


Figura 2. Agentes proteolíticos responsáveis pela maturação de queijos.

Fonte: SOUSA; ARDÖ; MCSWEENEY, 2001.

Assim, as enzimas proteolíticas catalisam a transformação da caseína em peptídeos pequenos e em aminoácidos livres, que contribuem diretamente para o sabor ou indiretamente, agindo como precursores de substâncias aromáticas como aminas, ácidos, tióis, tioésteres, característicos dos queijos (WIT et al., 2005; GOROSTIZA et al., 2004).

Durante a proteólise primária, a caseína começa a ser degradada. Se essa degradação resultar na formação de peptídeos amargos, haverá produção de gosto amargo, principalmente quando a formação desses peptídeos for mais rápida do que sua hidrólise, realizada pelas enzimas proteolíticas produzidas pelas culturas lácticas (NAGODAWITHANA; REED, 1993). A análise de peptídeos amargos formados a partir de caseína inteira revela que eles são originados das frações α_{s1} - e β -, as quais contêm altos níveis de aminoácidos hidrofóbicos (KOKA; WEIMER, 2000).

A renina atua em todas as frações de caseína produzindo gosto amargo, sendo que proteases de culturas lácticas produzem amargor a partir da β -caseína (KOKA; WEIMER, 2000).

I.1.2 Proteases fúngicas

Microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica e a sua susceptibilidade à manipulação genética. Microrganismos crescem rapidamente e, em geral, seus substratos para crescimento são relativamente baratos (TUBESHA; AL-DELAIFY, 2003), o que os tornam constantemente disponíveis. Proteases microbianas representam aproximadamente 40% de toda a venda mundial de enzimas (RAO et al., 1998).

Fungos têm sido amplamente empregados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, principalmente, as enzimas. São obtidos através de processos fermentativos e proporcionam a vantagem de não tornar necessário o uso de métodos caros de filtração, pois seu micélio pode ser facilmente removido, por filtração a vácuo ou centrifugação, obtendo-se um extrato livre de micróbios (ANDRADE et al., 2002). Geralmente as enzimas produzidas por fungos são extracelulares, o que facilita o processo de recuperação do meio de fermentação. Além disso, o uso de fungos, como produtores de enzimas, é mais seguro do que bactérias já que normalmente são considerados como GRAS (*Generally Regarded As Safe*) (GERMANO et al., 2003).

Fungos termofílicos são os principais componentes da microflora que se desenvolve em grandes massas de material vegetal, de produtos agroindustriais e florestais e outras acumulações de matéria orgânica onde o ambiente quente, úmido e aeróbio fornece as condições básicas para seu desenvolvimento. Possuem temperatura mínima de crescimento • 20°C e temperatura máxima de crescimento • 50°C. Devido ao fato dos fungos termofílicos ocorrerem em habitats terrestres que são heterogêneos em termos de temperatura e tipos de nutrientes, substâncias químicas, gases, atividade de água entre outras variáveis, eles tornaram-se capazes de se adaptarem a vários fatores ambientais e não somente à alta temperatura (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000). Os processos fermentativos destes fungos, para produção enzimática, ocorrem a temperaturas elevadas, o que diminui o risco de contaminação microbiana.

Microrganismos termofílicos são capazes de existir sob condições ambientais extremas. Em geral, proteínas desnaturam-se sob elevadas temperaturas (40-55°C), mas enzimas produzidas por microrganismos termofílicos são caracterizadas por possuírem maior termoestabilidade e atividade catalítica ótima em altas temperaturas e algumas, podendo suportar temperaturas até 100°C sem perder atividade biológica (KALOGERIS et al., 2003).

Tais enzimas termoestáveis são muito importantes como catalisadores em processos técnicos que ocorrem a altas temperaturas (GEY & UNGER, 1995). Proteases termoestáveis apresentam vantagens em algumas aplicações pois possibilitam o emprego de temperaturas de processo mais altas, implicando em taxas de reação mais elevadas, aumento na solubilidade de reagentes e produtos e redução na incidência de contaminação por microrganismos mesofílicos (SOOKKHEO et al., 2000). Assim, o interesse em enzimas termoestáveis tem crescido na medida em que a resistência à inativação térmica se tornou uma propriedade desejada de enzimas para aplicações em processos industriais.

I.1.3 Fermentação

Fermentação é um processo que acompanha o desenvolvimento microbiano e é uma ferramenta importante na obtenção de diversos produtos, tais como biomassa microbiana, vitaminas, hormônios, pigmentos, enzimas, biosurfactantes, biopesticidas, etc. (SCHMIDELL et al., (a) 2001; PANDEY, 2003).

Sistemas de fermentação em estado sólido (FES) e líquida ou submersa (FSm) têm sido utilizados para produção de proteases (SANDHYA et al., 2005). A primeira ocorre com baixo conteúdo de umidade, geralmente 60-70% enquanto que a última ocorre com maior teor, geralmente acima de 90%.

FES pode ser definida como: ‘processo que se refere à cultura de microrganismos sobre ou dentro de partículas em matriz sólida (substrato ou material inerte), onde o conteúdo líquido ligado a ela está a um nível de atividade de água que, por um lado, assegure o crescimento e metabolismo das células e, por outro, não exceda à máxima capacidade de ligação da água com a matriz sólida’ (SCHMIDELL et al., (a) 2001).

De acordo com Germano et al. (2003), Pandey (2003), Sandhya et al. (2005), FES oferece muitas vantagens em relação a FSm:

- Utilização de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo, soja, algodão, arroz, bagaço de laranja, bagaço de cana, entre muitos outros;
- Utiliza quantidade de água muito pequena, permitindo uma produção mais concentrada dos metabólitos, diminuindo a formação de água residual, diminuindo problemas de contaminação por bactérias durante o processo fermentativo e ainda favorecendo o desenvolvimento de fungos filamentosos, que geralmente crescem na

natureza em substratos sólidos como madeira, raízes e folhas de plantas e outros materiais orgânicos;

- Por ser um processo estacionário, não acarreta em custos energéticos adicionais;
- Afirma-se que as produções enzimáticas são maiores.

A seleção do substrato adequado para FES é muito importante, pois este material sólido atua como suporte físico além de fornecer nutrientes ao microrganismo (PANDEY, 2003).

Vários estudos descrevem a eficiência da síntese de proteases extracelulares por fungos, durante processos fermentativos. No trabalho de Andrade et al. (2002) determinou-se que a linhagem de *Mucor circinelloides* foi um bom produtor de protease; Sumantha et al. (2005) encontraram uma linhagem de *Aspergillus* que se mostrou boa produtora de protease neutra, por FES a 30°C por 48 horas; Benito et al. (2002) estudaram a protease de *Penicillium chrysogenum* Pg222 produzida em FSm, a 25°C por 4 dias; Germano et al. (2003) mostraram a possibilidade de produzir protease por *Penicillium* sp. em FES com 55% de umidade, a 28°C, por 2 dias utilizando torta de soja desengordurada como substrato; três espécies de *Fusarium* produziram proteases no trabalho de Pekkarinen et al. (2000); Wu; Hang (2000) estudaram a produção de uma protease ácida por *Neosartorya fischeri*; Tunga; Shrivastava; Banerjee (2003) estudaram a protease produzida por *Aspergillus parasiticus* em FES, a 32°C, por 3 dias utilizando farelo de trigo como substrato; *Aspergillus niger* também produziu protease no trabalho de Coral et al. (2003); *Streptomyces clavuligerus* produziu proteases extracelulares por fermentação em batelada utilizando farinha de soja como fonte de nitrogênio no trabalho de Moreira et al. (2001); Sandhya et al. (2005) obtiveram melhores resultados para produção de protease utilizando uma linhagem de *Aspergillus oryzae* em FES a 30°C, por 3 dias utilizando farelo de trigo como substrato; Ferreira; Boer; Peralta (1999) encontraram alta produção de protease por *Aspergillus tamaris* durante FES por 5 dias em farelo de trigo; Agrawal et al. (2005) demonstraram o potencial do fungo *Beauveria felina* como fonte de uma protease alcalina para aplicação comercial na hidrólise de proteínas de soja; Chellappan et al. (2006) apresentaram o fungo *Engyodontium album* BTMFS10 como outra fonte de protease, cujas condições ótimas de produção foram em FES com 60% de umidade, a 25°C, por 5 dias utilizando farelo de trigo como substrato;

Produção de protease por fungos termofílicos foi relatada por Jensen et al. (2002), que encontraram atividade proteolítica no extrato produzido por *Thermomyces lanuginosus* em cultivo contínuo a 50°C; por Li; Yang; Shen (1997), que também estudaram o fungo *Thermomyces lanuginosus* e encontraram uma protease altamente termoestável (100% de

atividade a 50°C por 2,5 horas) produzida em FSm com suplementação de 4% de caseína, a 50°C por 12 dias; Hashimoto; Iwaasa; Yokotsuka (1972) encontraram uma protease termoestável (100% a 60°C por 1 hora) produzida por *Penicillium duponti* K1014 em 2 dias de FES com farelo de trigo; Ong; Gaucher (1973) determinaram que *Humicola lanuginosa* (hoje conhecido como *Thermomyces lanuginosus*) e *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* foram bons produtores de proteases termoestáveis (até aproximadamente 70°C por 1 hora) em FSm, a 45°C por 30-50 horas.

Percebe-se que há poucos relatos na literatura de produção de proteases termoestáveis por fungos termofílicos e ainda que a maioria desses relatos são antigos. Esse tipo de protease é mais estudado em bactérias termofílicas do gênero *Bacillus* (EL HADJ-ALI et al., 2006; JOHNVESLY; NAIK, 2001; JOHNVESLY; MANJUNATH; NAIK, 2002; MATTA; PUNJ, 1998; SELLAMI-KAMOUN et al., 2006;) e outras como *Streptomyces* sp. (DE AZEREDO et al., 2004).

Fungos também são investigados para produção de proteases coagulantes. Vários pesquisadores obtiveram sucesso na tentativa de encontrar substitutos de renina produzidos por fungos. Fernandez-Lahore et al. (1999) encontraram uma proteinase ácida com alta atividade coagulante produzida no quarto dia de FES por uma linhagem mesofílica de *Mucor* sp. (M-105). Hashem (1999) investigou a produção de enzimas coagulantes extracelulares por sete culturas fúngicas e determinou que *Penicillium oxalicum* foi o produtor mais promissor, em cultivo estacionário por 8 dias. Tubesha; Al-Delaimy (2003) encontraram, dentre 20 linhagens de *Mucor* isoladas na Jordânia, um bom produtor de enzima coagulante, cujas condições ótimas de cultivo ocorreram em FES por 4 dias a 30°C, utilizando uma mistura fortificada de farelo de trigo como substrato. Kumar et al. (2005) apresentaram uma protease ácida com possíveis características de enzima coagulante produzida por *Rhizopus oryzae* em fermentação sólida a 30°C por 2 dias, utilizando farelo de trigo como substrato. Shata (2005) relatou sobre as condições ótimas para extração de uma enzima coagulante produzida por *Aspergillus oryzae* em FES utilizando farelo de trigo como substrato. Nos estudos de Silveira et al. (2005) averiguou-se a produção de renina microbiana pelo zigomiceto *Mucor miehei*, um dos mais pesquisados para este tipo de síntese, via FES utilizando vários resíduos agroindustriais.

I.1.4 Propriedades catalíticas de Proteases

As proteases catalisam a mesma reação química, porém exibem preferências de acordo com os grupos presentes nas proximidades das ligações peptídicas. Assim, tem-se exopeptidases, que exibem preferência pelas extremidades C- ou N- terminais da cadeia peptídica, sendo específicas pelos grupos carboxila ou amino livres; e endopeptidases, que atuam dentro da cadeia peptídica e cuja especificidade depende das cadeias laterais de aminoácidos encontradas na vizinhança do sítio de hidrólise (POLGÁR, 1989).

Outro critério de classificação, além da especificidade, é em relação ao mecanismo catalítico, que designa as proteases em quatro principais grupos: serino-proteases, cisteíno-proteases, proteases aspárticas e metaloproteases. Este mecanismo pode ser determinado indiretamente através da reatividade da enzima em relação a inibidores de resíduos de aminoácidos na região do sítio ativo (LI, YANG, & SHEN, 1997).

Segundo Rao et al. (1998), serino-proteases são caracterizadas pela presença de um grupo serino no seu sítio ativo e são reconhecidas pela inibição irreversível por PMSF, entre outros; proteases aspárticas, comumente conhecidas como proteases ácidas, são endopeptidases que dependem de resíduos aspárticos ácidos para sua atividade catalítica e são inibidas por pepstatina; cisteíno-proteases possuem sua atividade dependente de um par catalítico contendo cisteína e histidina e geralmente são ativas somente na presença de agentes redutores como a cisteína; metaloproteases constituem o tipo catalítico mais diverso das proteases e são caracterizados pela necessidade de um íon metálico divalente para sua atividade e por isso são inibidas por quelantes de metais como o EDTA.

É interessante ressaltar que o critério baseado no mecanismo de ação garante uma melhor classificação inicial das proteases, já que uma mesma protease pode atuar tanto como exo- quanto como endopeptidases (POLGÁR, 1989).

I.1.5 Purificação de enzimas

A purificação enzimática é um processo complexo que elimina constituintes indesejáveis do meio de cultivo como, por exemplo, a elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas constituintes do meio de cultura, outros metabólitos extracelulares

que não a proteína de interesse, além de metabólitos intracelulares originados de células mortas e fragmentos celulares (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). Assim, a proteína de interesse é isolada do meio e suas características específicas podem ser determinadas.

Devido às diferenças de cada produção enzimática (tipo de fermentação, tipo de meio de cultivo, microrganismo) não existe um protocolo definido para purificação de proteínas. É necessário desenvolver um protocolo específico, que geralmente engloba algumas etapas como: clarificação da amostra, geralmente por técnicas de filtração e/ou centrifugação, onde se obtém o extrato enzimático bruto; concentração da amostra, geralmente por ultrafiltração ou precipitação por sais ou solventes orgânicos; e, finalmente, através de técnicas cromatográficas, ocorre a purificação de alta resolução (PESSOA JR.; KILIKIAN, 2005). O ideal é manter o processo simples e curto para que a recuperação da proteína em questão não seja muito prejudicada.

Há relatos de purificação de proteases fúngicas através do uso de diferentes procedimentos. Tunga; Shrivastava; Banerjee (2003) isolaram uma protease, com massa molecular estimada de 23 KDa, de *Aspergillus parasiticus* por precipitação com acetona seguida de cromatografias de troca iônica e filtração em gel. Kumar et al. (2005) purificou uma protease aspártica, com massa molecular de aproximadamente 34 KDa, de *Rhizopus oryzae* através de fracionamento com sulfato de amônia seguido de cromatografias de troca iônica e filtração em gel. Fernandez-Lahore et al. (1999) purificaram uma protease ácida da linhagem mesofílica *Mucor* sp. (M-105) por ultrafiltração e cromatografias de troca iônica e filtração em gel e determinaram seu peso molecular em torno de 33 KDa. Chellappan et al. (2006) purificaram a protease de *Engyodontium album* BTMFS10 através de precipitação com sulfato de amônia seguida de cromatografia de troca iônica, e estimaram a massa molecular da enzima em 38 KDa. Barata et al. (2002) apresentaram a purificação de uma serino-protease alcalina, obtida de *Fusarium oxysporum* var. *lini.*, através de cromatografia em Q-Sepharose, cromatografia de afinidade e finalmente em outra cromatografia de troca iônica e estimaram a massa molecular de 41 KDa. Hattori et al. (2005) purificaram uma protease obtida de *Cordyceps militaris* por precipitação com sulfato de amônia seguida de 3 cromatografias de troca iônica e determinaram a massa molecular de 23,405 KDa. Chakrabarti; Matsumura; Ranu (2000) purificaram a protease obtida de *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) após 7 etapas cromatográficas e estimaram a massa molecular de 37 KDa.

É interessante notar que, dentre as proteases citadas, todas possuem baixa massa molecular e que, portanto, proteases fúngicas provavelmente apresentarão essa característica.

I.2 Referências Bibliográficas

AFAF, S. F. et al. Characterization of a cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv Giza 164). **Bioresource Technology**, v. 91, n. 3, p. 297-304, 2004.

AGRAWAL, D. et al. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 1131-1136, 2005.

ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-110, 2002.

ANEMA, S. G.; LEE S. K.; KLOSTERMEYER, H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 99-106, 2005.

BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.

BENITO, M. J. et al. Purification and characterization of an extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* Pg222 active against meat proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 7, p. 3532-3536, 2002.

CAPIRALLA, H. et al. Purification and characterization of a hydrophobic amino acid specific endopeptidases from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 4, p. 571-579, 2002.

CHAKRABARTI, S. K.; MATSUMURA, N.; RANU, R. S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). **Current Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 239-244, 2000.

CHELLAPPAN, C. S. et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 956-961, 2006.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

CORAL, G. et al. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. **Annals of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 491-498, 2003.

DALGLEISH, D. G.; SPAGNUOLO, P. A.; GOFF, G. D. A possible structure of the casein micelle based on high-resolution field-emission scanning electron microscopy. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1025-1031, 2004.

DE AZEREDO L.A.I. et al. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, n. 4, p. 354-358, 2004.

EL HADJ-ALI, N.; AGREBI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, In Press, 2006.

ESKIN, N. A. M.; HENDERSON, H. M; TOWNSEND, R. J. **Biochemistry of Foods**. NY: Academic Press, 1971. p. 139, 140.

FERNANDEZ-LAHOIRE, H.M. et al. Purification and characterization of an acid proteinase from mesophilic *Mucor* sp. solid-state cultures. **Journal of Peptide Research**, v. 53, n. 6, p. 599-605, 1999.

FERREIRA, G.; BOER, C. G.; PERALTA, R. M. Production of xylanolytic enzymes by *Aspergillus tamaraii* in solid state fermentation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, n. 2, p. 335-339, 1999.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 234-237, 2006.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.

GEY, M. H.; UNGER, K. K. Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. **Journal of Chromatography B**, v. 666, n. 1, p. 188-193, 1995.

GOROSTIZA, A. Changes in soluble nitrogenous compounds, caseins and free amino acids during ripening of artisanal prato cheese; a Brazilian semi-hard cows variety. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 407-414, 2004.

GUAN, X. et al. Some functional properties of oat bran protein concentrate modified by trypsin. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 163-170, 2007.

GUPTA, R. et al. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HASHEM, A. M. Optimization of milk-clotting productivity by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 70, n. 2, p. 203-207, 1999.

HASHIMOTO, H.; IWAASA, T.; YOKOTSUKA, T. Thermostable acid protease produced by *Penicillium duponti* K1014, a true thermophilic fungus newly isolated from compost. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 986-992, 1972.

HATTORI, M. et al. Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 631-636, 2005.

JENSEN, B. et al. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 1, p. 41-45, 2002.

JOHNVESLY, B.; MANJUNATH, B. R.; NAIK, G. R. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 61-64, 2002.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 139-144, 2001.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1, p. 75-79, 2000.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 1999.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LAW, B. A. **Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk**, 2 ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 1-6.

LI, D.C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LÓPEZ, L. M. I. et al. Purification and characterization of Macrodonatin I, a cysteine peptidase from unripe fruits of *Pseudananas macrodonta* (Morr.) Harms (Bromeliaceae). **Protein Expression and Purification**, v. 18, n. 2, p. 133-140, 2000.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 139-145, 1998.

MORATO, A. F. et al. Optimization of casein hydrolysis for obtaining high contents of small peptides: use of subtilisin and trypsin. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, n. 5, p. 843-857, 2000.

MOREIRA, K. A. et al. Partial characterization of proteases from *Streptomyces Clavuligerus* using an inexpensive medium. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 215-220, 2001.

MOREIRA, K. A. et al. Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307-312, 2002.

MOTA, M.V.T. et al. Trypsin hydrolysis of whey protein concentrates: characterization using multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v. 94, n. 2, p. 278-286, 2006.

NAGODAWITHANA, T.; REED, G. **Enzymes in Food Processing**. NY: Academic Press Inc., 1993.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

ONG, P. S.; GAUCHER, G. M. Protease production by thermophilic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 129-133, 1973.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 81-84, 2003.

PEDROCHE, J. et al. Production and characterization of casein hydrolysates with a high amino acid Fischer's ratio using immobilized proteases. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 527-533, 2004.

PEKKARINEN, A. et al. Production of proteases by *Fusarium* species grown on barley grains and in media containing cereal proteins. **Journal of Cereal Science**, v. 31, n. 3, p. 253-261, 2000.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. Barueri: Manole, 2005. p. 1-196.

POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Florida: CRC Press, Inc., 1989. p. 43-46, 62-64.

RAO M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Cheesemaking Practice**. 3. ed. NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998. p. 48-51, 146-163.

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.

SCHMIDELL, W. et al. (a) **Biotecnologia Industrial**. Volume 2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 247-270.

SCHMIDELL, W. et al. (b) **Biotecnologia Industrial** Volume 4. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 388, 392, 412, 413.

SELLAMI-KAMOUN, A. et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, In Press, 2006.

SGARBIERI, V. C. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 241-247, 2005.

SILVEIRA, G. G. et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehi* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 931-937, 2005.

SINHA, R. et al. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.

SOOKKHEO, B. et al. Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Protein Expression and Purification**, v. 20, n. 2, p. 142-151, 2000.

SOUSA, M. J.; ARDÖ, Y.; McSWEENEY, P. L. H. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 5, p. 327-345, 2001.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metaloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

TRUJILLO, A. J. et al. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 449-457, 2000.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIFY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 237-241, 2003.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553-1558, 2003.

TURNER, K. The use of proteases to remove protein-based residues from solid surfaces. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 10, p. 3377-3382, 2005.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. **Milk and Milk Products, Technology, Chemistry and Microbiology**. 2. ed. London: Aspen Publishers, Inc., 2001. p. 1-13.

WILKINSON, M. G.; KILCAWLEY, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 8, p. 817-830, 2005.

WIT, M. De et al. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 6, p. 606-616, 2005.

WU, L. C.; HANG, Y. D. Acid protease production from *Neosartorya fischeri*. **Lebensm-Wiss u-Technol.**, v. 33, n. 1, p. 44-47, 2000.

Capítulo II

Produção e caracterização de protease do extrato enzimático bruto do fungo termofílico
Thermoascus aurantiacus

Produção e caracterização de protease do extrato enzimático bruto do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*

Resumo

Proteases são enzimas muito importantes industrialmente, com considerável aplicação no setor alimentício. O objetivo deste trabalho foi estudar a protease do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* por fermentação em estado sólido (FES). Para compreender o seu mecanismo de ação, fez-se um estudo com inibidores e foi observado inibição principalmente por EDTA (60,61%) e também por PMSF (56,37%). Para elucidar seu modo de ação proteolítico, seu perfil hidrolítico sobre a caseína foi estudado por dois métodos: 1) hidrólise enzimática sobre solução de caseína 1%, analisada por variação de absorbância a 280 nm e 2) hidrólise enzimática sobre solução de leite em pó desnatado, analisada por UREA-PAGE, os quais foram comparados com uma protease comercial e mostraram que a protease não possui a mesma especificidade que a renina bovina.

II.1 Introdução

Proteases constituem um grupo importante de enzimas e representam aproximadamente 60% do total de vendas de enzimas já que são utilizadas nas indústrias de detergentes, cerveja, carnes couro e em laticínios (KUMAR et al., 2005).

Várias investigações têm sido realizadas no intuito de obter proteases de fungos como *Thermomyces lanuginosus* (JENSEN et al., 2002; LI; YANG; SHEN, 1997), *Aspergillus* (CORAL et al., 2003; TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERFEE, 2003; SHATA, 2005), *Penicillium* (HASHEM, 2000; GERMANO et al., 2003), *Mucor* (MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; ALVES et al., 2002; TUBESHA; AL-DELAIFY, 2003); *Rhizopus oryzae* (KUMAR et al., 2005). Entretanto, suas atividades hidrolíticas nem sempre são esclarecidas.

Vários estudos descrevem a eficiência de síntese enzimática pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*, durante processos fermentativos, como as enzimas celulolíticas

(KALOGERIS et al., 2003), amilolíticas (CARVALHO et al., 2006), pectinolíticas (MARTINS et al., 2002), xilanase (DA-SILVA et al., 2005; MILAGRES et al., 2004; SOUZA; ROBERTO; MILAGRES, 1999) e catalase (WANG et al., 1998). Porém não há relatos recentes de produção de protease por este microrganismo.

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a protease do extrato enzimático bruto produzido pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo suplementado com diferentes quantidades de caseína como substratos e estudar sua hidrólise sobre a caseína bovina para melhor entender sua atividade proteolítica.

II.2 Materiais e Métodos

II.2.1 Microrganismo

O fungo *Thermoascus aurantiacus*, obtido da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP, foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL inclinados contendo 50 mL do meio Sabouraud e cresceu em estufa a 50°C por dois dias. Após este período de crescimento ficou armazenado à temperatura ambiente.

II.2.2 Inóculo

A cada frasco contendo o fungo foi adicionado 100 mL de solução salina esterilizada, composta dos seguintes sais: sulfato de amônia ((NH₄)₂SO₄), sulfato de magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) e nitrato de amônia (NH₄NO₃), na concentração de 0,1% para cada sal. A superfície do meio foi raspada suavemente obtendo-se uma suspensão de micélios, que foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

II.2.3 Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática

Foram preparados e esterilizados (120°C/40min), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, meios contendo apenas farelo de trigo (FT) ou farelo de trigo com caseína em diferentes proporções (5, 10 e 20%, sendo o meio composto por 20% de caseína denominado FTC), totalizando 5 g de substrato.

Os meios foram inoculados com 10,60 mL da suspensão micelial, obtendo-se assim 70% de umidade, e foram incubados a 45°C estacionariamente por até 5 dias. Após o crescimento da cultura, 40 mL de água destilada foram adicionados aos meios para a extração enzimática. Os frascos foram agitados a 100 rpm / 30 minutos, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 15000 rpm / 20 minutos. A solução obtida, denominada extrato enzimático bruto, foi congelada e posteriormente utilizada para os ensaios enzimáticos.

II.2.4 Determinação da atividade proteolítica

Determinada de acordo com Kembhavi; Kulkarni; Panti (1993), com modificações. A mistura da reação foi composta de 0,4 mL de caseína (Sigma) 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 como substrato; 0,4 mL tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,2 mL de extrato enzimático. A mistura de reação foi incubada a 60°C e ao final de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de TCA 10%. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm/5 minutos e fez-se a leitura do sobrenadante a 280 nm. Preparou-se um controle, onde o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições do ensaio.

II.2.5 Determinação da atividade coagulante no leite

Determinada de acordo com Kumar et al. (2005), com modificações. Pré-incubou-se, a 45°C por 10 minutos, 5 mL de leite em pó desnatado (Itambé) 10% (p/v) reconstituído em água destilada com adição de CaCl₂ 0,01 M, denominado leite de ensaio. Adicionou-se 0,5 mL de solução enzimática e iniciou-se a contagem do tempo. Observou-se a formação do coágulo enquanto rodava-se continuamente o tubo de ensaio inclinado manualmente sem retirá-lo do banho. Mediu-se o tempo em que as primeiras partículas foram formadas na borda interna do tubo. Uma unidade de atividade coagulante (UAC) é definida como a quantidade de enzima necessária presente em 1 mL de solução enzimática que coagula 10 mL de substrato em 40 minutos e foi calculada de acordo com Shata (2005): Unidades de atividade coagulante (UAC) = $2400/T \times S/E$, onde T é o tempo necessário para formação do coágulo, S é o volume de leite e E é o volume de enzima.

II.2.6 Caracterização da protease no extrato enzimático bruto obtido de FTC

II.2.6.1 Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica

O extrato enzimático obtido da fermentação foi armazenado durante 10 semanas a 25°C, 7°C, ambos com adição de 0,2% de azida sódica para prevenir crescimento microbiano, e a -20°C. A cada semana foram feitas reações enzimáticas para determinar a estabilidade da enzima durante a estocagem. A atividade proteolítica residual foi determinada e comparada ao controle, que foi determinado no dia da extração (tempo zero) e corresponde a 100% de atividade.

II.2.6.2 Efeito de sais e inibidores de protease na atividade proteolítica

Para esses experimentos, o extrato enzimático bruto foi precipitado pela adição de 3 volumes de álcool comercial (- 20°C). Essa mistura foi mantida a 5°C por aproximadamente 12 horas. A enzima precipitada obtida foi centrifugada a 10000 rpm / 20 minutos a 5°C. O precipitado foi dissolvido em tampão acetato 0,2 M pH 5,5, e o resíduo insolúvel foi removido por centrifugação a 10000 rpm / 10 minutos. A solução enzimática foi então filtrada em uma membrana Millex com tamanho de poro de 0,45 µm e usada para os seguintes estudos.

Diferentes íons, incluindo Al^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Na^{+} na forma de sais cloreto e diferentes inibidores específicos de protease incluindo inibidor de serino-proteases (PMSF), inibidor de metaloproteases (EDTA) e inibidor de cisteíno-proteases (ácido iodoacético), a uma concentração final de 0,1; 1,0 ou 10 mM, foram adicionados a 0,2 mL de solução enzimática. As amostras foram incubadas a 60°C por 10 minutos e 0,4 mL de tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,4 mL de caseína 0,5% foram então adicionados. A atividade proteolítica residual foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência dos agentes e corresponde a 100% de atividade.

II.2.6.3 Estudo comparativo dos ensaios enzimáticos: protease x coalho comercial

Esses estudos e os seguintes foram realizados com a protease produzida no meio de fermentação FTC, já que há relatos de que a caseína é um indutor para a produção de enzimas coagulantes (ESCOBAR; BARNETT, 1995), e com um coalho comercial (Chy-Max, 4-6mL/100L de leite) a fim de compreender melhor o perfil hidrolítico da protease.

Realizaram-se os ensaios de atividade proteolítica e coagulante para cada enzima, como descritos nos itens II.2.4, II.2.5, e determinou-se a razão entre os resultados da seguinte maneira: razão = atividade coagulante / atividade proteolítica.

II.2.6.4 Efeito da concentração de CaCl_2 na coagulação do leite

Procedeu-se como descrito no item II.2.5, porém utilizando concentrações crescentes da solução de cloreto de cálcio (0; 0,01; 0,1; 0,5 e 1,0 M).

II.2.6.5 Estudo do padrão de ação da protease

II.2.6.5.1 Monitoramento de atividade proteolítica

Determinada de acordo com Silva; Malcata (2005), com modificações. Adicionou-se 0,2 mL de solução enzimática a 1,8 mL de solução de caseína 1% (p/v) preparada em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 contendo azida sódica 0,03% (p/v), para prevenir crescimento microbiano. As misturas foram incubadas a 45°C por diferentes tempos (20, 40, 80 minutos, 2, 5, 8, 11 e 24 horas) e ao final de cada período foram fervidas por 6 minutos para inativação enzimática. A atividade proteolítica foi quantificada pela avaliação dos peptídeos solúveis em TCA 5% (p/v); alíquotas de cada amostra foram tratadas com TCA 5% (p/v) em uma razão volumétrica 1:2; a mistura descansou por 10 minutos e foi então centrifugada a 10.000 g por 10 minutos. Mediu-se a absorbância do sobrenadante a 280 nm.

II.2.6.5.2 Monitoramento da degradação da caseína do leite

A) Hidrólise enzimática do leite

Adicionou-se 0,1 mL de solução enzimática a 0,9 mL de solução 10% (p/v) de leite em pó desnatado em CaCl_2 0,01 M. As misturas foram incubadas a 45°C por diferentes tempos (5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos) e ao final de cada período foram fervidas por 6 minutos para inativação enzimática. Após centrifugação (5.000 rpm/5 min) o

precipitado foi utilizado para monitorar a proteólise: incubou-se 20 mg do precipitado em tubos eppendorf com 0,4 mL de tampão Tris-HCl 0,062 M pH 6,7 contendo 42% de uréia (p/v) a 37°C por 1 hora. Ao final desse período foram adicionados 10µL de β-mercaptoetanol e reincubou-se por mais 45 minutos e finalmente adicionou-se uma gota de azul de bromofenol (SHALABI; FOX, 1987).

B) Eletroforese

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida UREA-PAGE, de acordo com Shalabi; Fox (1987), a 80 V e os géis foram corados *overnight* com Coomassie Brilliant Blue G-250 e descorado com solução de metanol/ácido acético/água 3:1:6.

II.3 Resultados e Discussão

II.3.1 Produção da enzima

A Figura 1 mostra o perfil de produção de protease pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* (protease-TA). Testou-se meios de fermentação compostos por diferentes proporções de farelo de trigo e caseína. Nota-se que, com exceção do meio adicionado de 10% de caseína, houve produção máxima de protease no segundo dia (48 horas), o que tornou este período ideal para a produção enzimática.

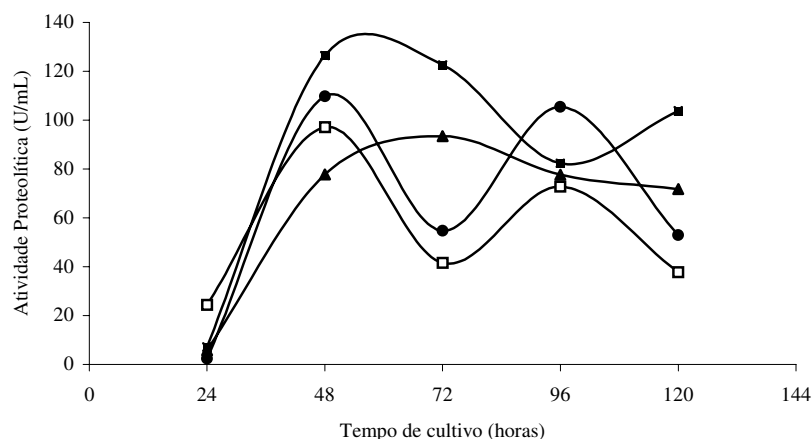


Figura 1. Produção de protease por *T. aurantiacus*. Meios de fermentação compostos de 100% Farelo de trigo - FT (●); 95% Farelo de Trigo + 5% caseína (○); 90% Farelo de Trigo + 10% caseína (▲); 80% Farelo de Trigo + 20% caseína - FTC (■).

Na tentativa de melhorar ainda mais a produção da enzima, testou-se meios de fermentação compostos por diferentes proporções de farelo de trigo e caseína. Nota-se que, com exceção do meio adicionado de 10% de caseína, houve produção intermitente de protease com 48 e 96 horas para zero e 5% de suplementação e com 48 e 120 horas para 20% de suplementação. Percebe-se também que a adição de caseína aos meios de cultivo, exceto 10%, proporcionou um aumento de produção da atividade proteolítica proporcional à concentração de caseína, no período de 48 horas. No meio suplementado com 10% de caseína o pico de produção ocorreu com 72 horas. No meio contendo 20% de caseína o pico de produção ocorreu com 48 horas e praticamente se manteve estável até 72 horas. Nota-se também que esse aumento da produção foi maior com a adição de 20% de caseína.

O microrganismo foi capaz de se desenvolver em condições estacionárias e secretar extracelularmente a enzima, em período de tempo relativamente curto (48 horas) em se tratando de fungos, mostrando-se então promissor para este processo fermentativo.

Os resultados obtidos mostraram que o farelo de trigo por si só foi um bom substrato para a produção de protease (aproximadamente 97 U/mL), o que também foi constatado por outros autores (SANDHYA et al., 2005; AGRAWAL et al., 2005; CHELLAPPAN et al., 2006).

Investigações para produção de protease por outras culturas fúngicas mostram que a quantidade de enzima produzida varia de acordo com o meio de cultivo utilizado (ANDRADE et al., 2002), ou seja, o microrganismo se comportará de maneira diferente em diferentes tipos de substratos de fermentação. Isso pôde ser confirmado neste trabalho, onde FT (100% Farelo

de trigo) e FTC (80% Farelo de trigo + 20% caseína) proporcionaram 97,13 U/mL e 126,45 U/mL de atividade proteolítica, respectivamente. Bons resultados para produção de protease por fungos, devido à adição de caseína ao meio de cultivo, também foram relatados por Tremacoldi; Carmona (2005) e Silveira et al. (2005).

II.3.2 Caracterização da protease no extrato enzimático bruto

Os extratos enzimáticos brutos obtidos das fermentações FT e FTC foram caracterizados em trabalho anterior (MERHEB et al., 2006) quanto à temperatura ótima, pH ótimo, temperatura e pH de estabilidade e apresentaram atividade proteolítica máxima em pH 5,5 e a 60°C, permaneceram altamente estáveis em ampla faixa de pH de 3,0 a 9,5 e revelaram termoestabilidade até 60°C por 1 hora.

Sabendo-se que o período de 48 horas e a adição de 20% de caseína ao meio FT proporcionou a máxima produção enzimática escolheu-se a condição FTC/48 horas para produção enzimática para dar continuidade aos próximos estudos.

II.3.2.1 Efeito da Temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica

A inativação de enzimas durante a estocagem é um fator limitante para sua aplicação industrial. A Figura 2 mostra o efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica, para obter-se mais conhecimento sobre o comportamento da enzima durante a estocagem.

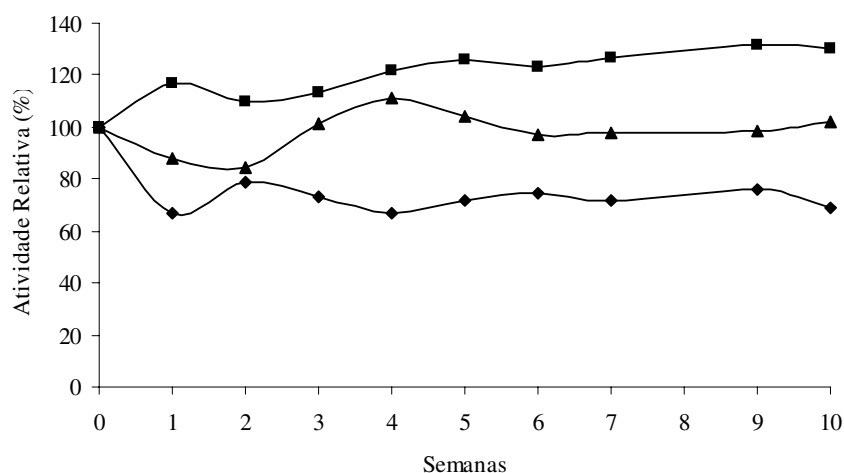


Figura 2. Efeito da temperatura e do tempo de armazenamento do extrato enzimático sobre a atividade proteolítica. Extrato armazenado a temperatura ambiente, 25°C (♦), em geladeira, 7°C (○) e congelada, -20°C (△). A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade no dia da extração (tempo zero).

Percebe-se que a amostra conservada a temperatura ambiente, manteve-se relativamente estável conservando aproximadamente 70% de sua atividade inicial até a nona semana, a partir da qual se observa uma queda. Já as amostras conservadas em temperatura de refrigeração e congelamento, apresentam um aumento de atividade a partir da terceira semana e permanecem assim até a décima semana, sendo que a amostra congelada exibe uma queda de atividade entre as semanas 5 e 9. Esse aumento de atividade pode ocorrer devido a uma mudança conformacional na molécula causada pelo resfriamento facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

Pode-se dizer que o armazenamento a 7 ou -20°C é adequado para a protease-TA pois assegura sua durabilidade.

II.3.2.2 Efeito de sais e inibidores de protease na atividade proteolítica

A Tabela 1 mostra o efeito de sais sobre a atividade enzimática da protease-TA. Houve elevada redução da atividade na presença de Al^{3+} (97,62%), Zn^{2+} (90,15%) e em menor intensidade na presença de Na^+ (46,69%). Os íons Mg^{2+} , Ba^{2+} e Ni^{2+} foram os que menos afetaram a atividade enzimática, com 5,94, 5,60 e 28,0% de inibição, respectivamente. O Ca^{2+} não apresentou efeito inibitório.

Tabela 1. Efeito de sais na atividade proteolítica do extrato enzimático precipitado. Ensaio realizado incubando-se o extrato por 10 minutos com cada sal e medindo-se a atividade residual, que representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de sais.

Sais	Concentração (mM)	Atividade Residual (%)
Controle		100,00
AlCl ₃	10	2,38
ZnCl ₂	10	9,85
MgCl ₂	10	94,06
CaCl ₂	0,1	96,94
CaCl ₂	1,0	100,17
NaCl	10	53,31
BaCl ₂	10	94,40
NiCl ₂	10	71,99

A fim de obter mais conhecimento sobre a natureza da protease-TA, a atividade enzimática foi determinada na presença de diferentes inibidores de protease.

A Tabela 2 mostra a susceptibilidade do extrato enzimático a inibidores de serino-proteases (PMSF), metaloproteases (EDTA) e cisteíno-proteases (ácido iodoacético).

Tabela 2. Efeito de inibidores de protease (10 mM) na atividade proteolítica do extrato enzimático precipitado. Ensaio realizado incubando-se o extrato por 10 minutos com cada inibidor e medindo-se a atividade residual que representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de inibidores.

Inibidores	Atividade Residual (%)	Classe de enzimas inibidas
Controle (sem inibidor)	100,00	
PMSF	43,63	Serino
EDTA	39,39	Melato
Ácido iodoacético	113,24	Cisteíno

Pode-se observar que houve considerável grau de inibição por EDTA (60,61%) e por PMSF (56,37%), indicando a possibilidade de existir dois tipos de proteases no extrato enzimático bruto: serino e metalo ou que seja uma metaloprotease contendo um resíduo serina no sítio ativo, como a protease de *Clostridium* sp. (ALAM et al., 2005). Esses resultados serão confirmados após a purificação enzimática. Percebe-se também uma leve estimulação da atividade enzimática pelo ácido iodoacético, sugerindo a ausência de uma cisteíno-protease.

II.3.2.3 Estudo comparativo dos ensaios enzimáticos: protease x coalho comercial

A Figura 3 mostra o efeito da temperatura sobre o tempo de coagulação do leite pela protease-TA. Nota-se que a temperatura de 45°C proporcionou um tempo de coagulação de aproximadamente 40 minutos, assemelhando-se ao tempo utilizado para produção de queijos em outros estudos (SILVA, 1998; CICHOSCKI et al., 2002). Assim, determinou-se que a temperatura de 45°C seria utilizada para os ensaios sobre perfil hidrolítico.

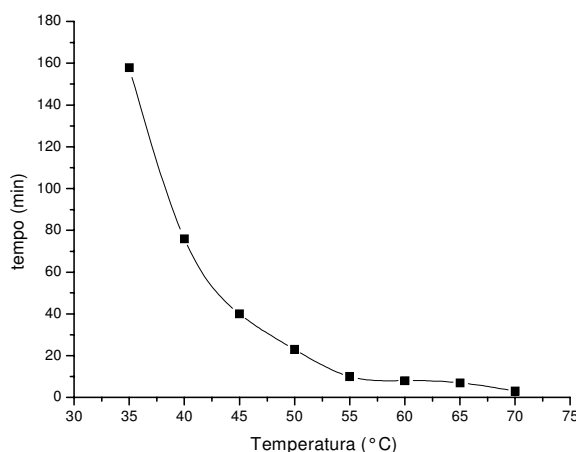


Figura 3. Efeito da temperatura no tempo de coagulação do leite por ação da protease no extrato enzimático bruto. Ensaio realizado adicionando-se o extrato enzimático ao leite previamente incubado em diferentes temperaturas.

Os resultados da Tabela 3 mostram que a protease-TA possui alta atividade proteolítica (64,10 U/mL) e baixa atividade coagulante (11,40 UAC/mL) quando comparada ao coalho comercial (9,69 U/mL e 40,00 U/mL, respectivamente), o que influi na grande diferença entre os valores das razões de atividades.

Tabela 3. Ensaios enzimáticos da protease do extrato enzimático bruto de *T. aurantiacus* e do coalho comercial, a 45°C.

	Atividade Proteolítica (U/mL)	Atividade Coagulante (UAC/mL)	Razão ^a
Protease	64,10	11,40	0,18
Coalho comercial	8,69	40,00	4,60

^a Razão entre atividades coagulante/proteolítica

A razão da atividade coagulante para a proteolítica é uma expressão significativa da utilidade de um extrato enzimático (ROBINSON; WILBEY, 1998). Para ser utilizada como um índice que justifique o aproveitamento do extrato como substituto de renina deve ser maior que 1, ou seja, possuir mais atividade coagulante do que proteolítica, como no trabalho de Hashem (2000) em que foi encontrado um alto valor para a razão entre as atividades (4,17) do extrato enzimático bruto produzido por *Penicillium oxalicum*, o que mostra que a protease obtida por este fungo pode ser considerada uma enzima coagulante.

O mesmo não ocorreu com o extrato enzimático de *T. aurantiacus* estudado em nosso trabalho, que apresentou um valor muito baixo para a razão entre as atividades (0,18). Portanto, utilizando o conceito de que a atividade coagulante deve ser maior que a atividade proteolítica, a protease não pode ser considerada como uma verdadeira enzima coagulante.

A protease-TA apresentou atividade coagulante similar (11,0 U/mL) à protease produzida por *Nocardia* sp. relatada por Cavalcanti et al. (2005). A grande diferença foi que, naquele trabalho, a atividade coagulante é muito maior que a atividade proteolítica (4 U/mg), o que permitiu àquela protease ser considerada um substituto de renina.

II.3.2.4 Efeito da Concentração de CaCl₂ na coagulação do leite

O cálcio tem sido descrito como uma substância importante na formação do gel durante a coagulação do leite, o que ocorre quando sua concentração é suficientemente alta (ANEMA; LEE; KLOSTERMEYER, 2005).

A Figura 4 mostra o efeito de diferentes concentrações de CaCl₂ na atividade coagulante da protease-TA e do coalho. Ambas as enzimas apresentam o mesmo perfil de atuação, com atividade máxima a 0,1 M de CaCl₂. Sabe-se que o cálcio tem importante

função na agregação das caseínas durante a segunda etapa da coagulação do leite, causada pela neutralização dos resíduos negativos das micelas de caseína (grupos fosfoserina e carboxílicos) por Ca^{2+} e complexos fosfato-cálcio (PIRES; ORELLANA; GATTI, 1999) e que o aumento da sua concentração aumenta a atividade coagulante (KUMAR et al. 2005). A atividade decresceu com concentrações maiores que 0,1 M, provavelmente devido ao aumento da força iônica ou pela saturação dos resíduos negativos das micelas com a crescente concentração de Ca^{2+} no meio; comportamento similar foi relatado por Vairo-Cavalli et al. (2005), que também encontraram um efeito bifásico da concentração de cálcio (aumento inicial de atividade coagulante, seguido de queda).

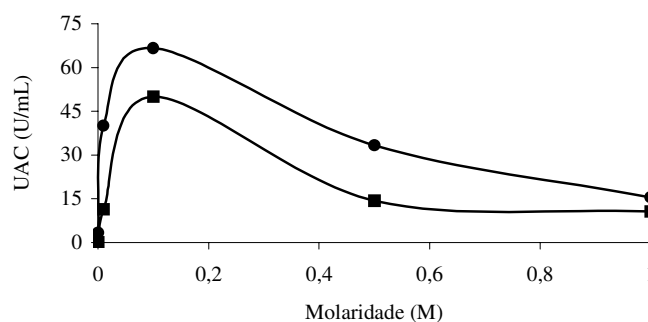


Figura 4. Efeito do CaCl_2 na atividade coagulante. Protease-TA (●) e coalho (■).

II.3.2.5 Estudo do padrão de ação da protease

II.3.2.5.1 Monitoramento de atividade proteolítica

Um dos métodos mais rápidos e mais usados para avaliação de proteólise em queijo é a quantificação de peptídeos solúveis em TCA, entre 2 e 12% (p/v); quanto maior a concentração de TCA, menor será o tamanho dos peptídeos solúveis (SILVA; MALCATA, 2005).

Os resultados da hidrólise enzimática sobre solução de caseína 1%, representados pela produção de peptídeos solúveis em TCA 5% (p/v), estão apresentados na Figura 5. Percebe-se

que as enzimas atuam de maneiras bastante diferentes: a protease-TA provoca extensa proteólise da caseína, que pode ser visto pela progressiva produção de peptídeos; já o coalho comercial não causa quebra extensiva da caseína, que pode ser visto pela baixa e constante formação de peptídeos.

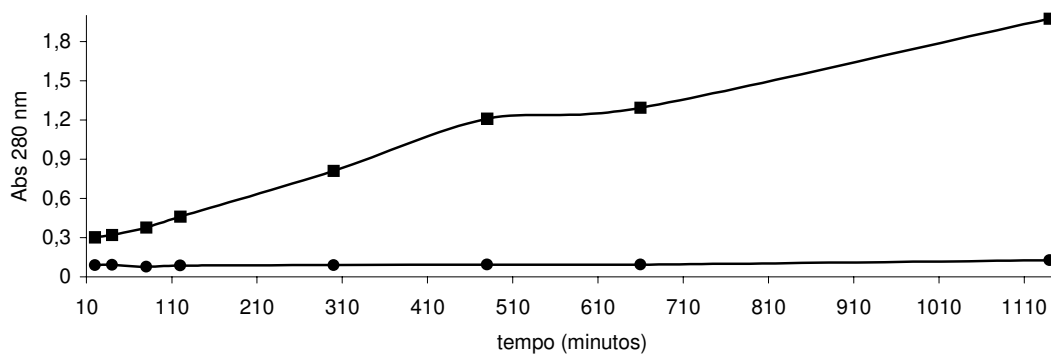


Figura 5. Variação de absorbância, que correlaciona com atividade proteolítica, com o tempo de incubação da caseína. Protease-TA (■) e coalho (●).

II.3.2.5.2 Monitoramento da degradação da caseína do leite

O comportamento hidrolítico de ambas as enzimas foi confirmado por outro método também freqüentemente utilizado para monitorar processos proteolíticos de caseínas: eletroforese em gel de uréia-poliacrilamida, que possibilita a visualização do comportamento das frações de caseína durante a hidrólise. Estes resultados estão apresentados nas Figuras 6 e 7.

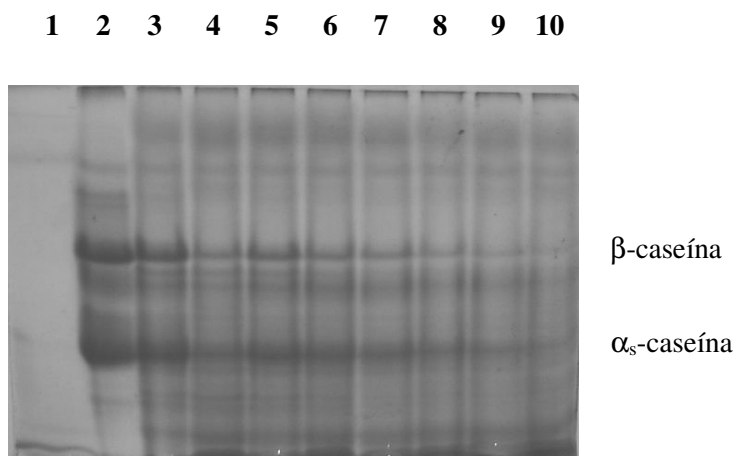


Figura 6. UREA-PAGE da hidrólise da caseína pela protease-TA. Colunas 1: solução enzimática; 2: leite de ensaio; 3-10: caseínas após incubação por 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, respectivamente.

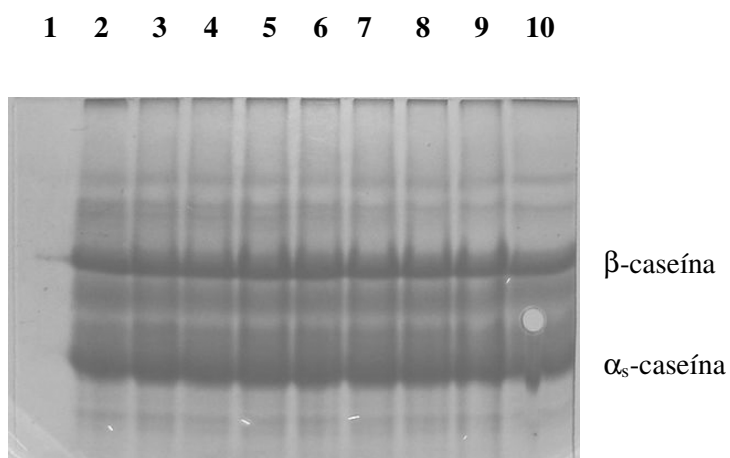


Figura 7. UREA -PAGE da hidrólise da caseína pelo coalho. Colunas 1: solução enzimática; 2: leite de ensaio; 3-10: caseínas após incubação por 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 minutos, respectivamente.

Para este experimento, foi utilizado o leite de ensaio para simular condições reais de coagulação.

Dois grandes grupos de caseínas foram identificados no UREA-PAGE: α_s -caseína, com maior mobilidade e β -caseína, com menor mobilidade eletroforética (SILVA; MALCATA, 2004).

Percebe-se na Figura 6 que as bandas correspondentes à fração β praticamente desaparecem com os 120 minutos de hidrólise pela protease-TA e que as bandas correspondentes à fração α_s aparentam resistir por mais tempo à ação da enzima. Assim, pode-se dizer que a protease-TA mostrou maior afinidade pela β -caseína.

A diferença no padrão hidrolítico é bastante clara e mostra que as enzimas agem de maneiras distintas: a protease-TA é extremamente proteolítica hidrolisando todas as frações da caseína, especialmente a β , após 10 min de incubação (Figura 6), enquanto que o coalho é altamente específico hidrolisando apenas a fração k, deixando as outras intactas (Figura 7). A falta de ação específica e conseqüentemente excesso de atividade proteolítica na caseína pode ter um impacto negativo na qualidade e rendimento do queijo produzido com esta protease como coagulante.

Trujillo et al. (2000) estudou a hidrólise de caseína de leite de ovelha por diferentes tipos de enzimas coagulantes comerciais. A enzima de origem fúngica (*Rhizomucor miehei*) apresentou baixa atividade proteolítica, com grande quantidade de caseínas intactas após 72 horas de incubação. Em nosso trabalho, há expressiva degradação das caseínas pela protease aos 120 minutos de incubação, o que descarta a possibilidade da sua aplicação para atuar como coagulante. O coagulante retido no coágulo é responsável pela quebra das caseínas durante a maturação do queijo, processo chamado de proteólise primária, sendo que as primeiras 24 horas depois de ocorrida a coagulação são as mais importantes bioquimicamente (SILVA; MALCATA, 2004). Sabe-se que proteólise excessiva provoca dissolução do coágulo com má formação do queijo e produção de gosto amargo devido à presença de peptídeos hidrofóbicos no produto final (SILVA; MALCATA, 2005). Portanto, enzimas proteolíticas retidas no coágulo, cuja atividade residual varia de 0 a 15% (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005), podem tanto acelerar a maturação do queijo através de uma rápida, porém adequada formação de peptídeos e posteriormente, por ação de outras peptidases, de aminoácidos ou ser responsável pelo gosto desagradável no queijo finalizado devido à proteólise excessiva, afetando suas características sensoriais.

As condições de maturação diferem em relação ao tempo, temperatura e umidade, de acordo com a variedade do queijo e pode se estender a partir de aproximadamente 6 meses até 3 anos, implicando em custos para o produtor (WILKINSON; KILCAWLEY, 2005) relacionados à imobilização de capital, à necessidades de grandes instalações refrigeradas, perdas de peso e deteriorações causadas por fermentações indesejadas (WIT et al., 2005). Assim, seria extremamente vantajosa a redução do período de maturação de queijos e

proteases encontram aplicação neste segmento. A Formase, protease fúngica, que foi adicionada ao queijo tipo Edam causou um aumento no índice de extensão de maturação e acelerou o desenvolvimento de sabor, quando comparado ao queijo produzido sem sua adição (NASR; EL-SAYED; EL-SAMRAGY, 2006). Essa pode ser uma possível aplicação da protease de *Thermoascus aurantiacus*, já que a etapa de maturação de queijos ocorre geralmente entre 12 a 15°C (SILVA; MALCATA, 2004), implicando em baixa proteólise pela protease-TA.

II.4 Conclusões

Os resultados apresentados neste estudo sugerem a possibilidade de produzir uma protease através de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo, que é um resíduo agroindustrial de baixo custo e sempre disponível, suplementado com caseína, a qual se mostrou boa coadjuvante na estimulação da produção de atividade proteolítica.

A caracterização da protease no extrato enzimático bruto, produzido pelo fungo *Thermoascus aurantiacus*, mostrou inibição principalmente por EDTA (60,61%) e também por PMSF (56,37%) sugerindo a presença de uma metaloprotease e de uma serino-protease no extrato.

A protease no extrato enzimático bruto apresentou comportamento proteolítico muito diferente do coalho comercial devido à hidrólise excessiva das caseínas do leite, evidenciando a ação proteolítica generalizada da enzima e sua baixa especificidade. Sugere-se estudos para verificar a atuação da protease-TA adicionada a queijos como ferramenta para acelerar o processo de maturação, já que foi comprovado que seu uso como coagulante não é adequado.

II.5 Referências Bibliográficas

AGRAWAL, D. et al. Alkaline protease production by a soil isolate of *Beauveria felina* under SSF condition: parameter optimization and application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1131-1136, 2005.

ALAM, S. I. et al. Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 824-831, 2005.

ALVES, M. H. et al. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 325-330, 2002.

ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-110, 2002.

ANEMA, S. G.; LEE S. K.; KLOSTERMEYER, H. Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 1, p. 99-106, 2005.

CARVALHO, A. F. A. et al. A specific short dextrin-hydrolyzing extracellular glucosidase from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* 179-5. **The Journal of Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 276-283, 2006.

CAVALCANTI, M. T. H. et al. Milk-clotting protease production by *Nocardiopsis* sp. in an inexpensive medium. **World Journal of Microbiology and Technology**, v. 21, n. 2, p. 151-154, 2005.

CHELLAPPAN, C. S. et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 956-961, 2006.

CICHOSCKI, A. J. Characterization of prato semi-hard cow variety: evolution of physical-chemical parameters and mineral composition during ripening. **Food control**, v. 13, n. 4-5, p. 329-336, 2002.

CORAL, G. et al. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. **Annals of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 491-498, 2003.

DA-SILVA, R. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p.235-241, 2005.

ESCOBAR, J.; BARNETT, S. Synthesis of Acid protease from *Mucor miehei*: Integration on Production and Recovery. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 695-700, 1995.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.

HASHEM, A. M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 3, p. 219-222, 2000.

JENSEN, B. et al. Enzymes production in continuous cultivation by the thermophilic fungus, *Thermomyces lanuginosus*. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 1, p. 41-45, 2002.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KEMBHAVI, A. A.; KULKARNI, A.; PANTI, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, n. 1-2, p. 83-92, 1993.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Investigation of the ability of a purified protease from *Pseudomonas fluorescens* RO98 to hydrolyze bitter peptides from cheese. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 1, p. 75-79, 2000.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LI, D.C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 461-488, 2000.

MARTINS, E. S. et al. Solid state production of thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 9, p. 949-954, 2002.

MERHEB, C. W. et al. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, In Press, 2006.

MILAGRES, A. M. F. et al. Production of xylanase by *Thermoascus aurantiacus* from sugar cane bagasse in an aerated growth fermentor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1387-1391, 2004.

NASR, M. M.; EL-SAYED, M. M.; EL-SAMRAGY, Y. A. Acceleration of Edam cheese ripening using acid fungal protease. **Food/Nahrung**, v. 35, n. 2, p. 143-148, 2006.

PIRES M. S.; ORELLANA G. A.; GATTI, C. A. Rennet coagulation of casein micelles and heated casein micelles: action of Ca^{2+} and pH. **Food Hydrocolloids**, v. 13, n. 3, p.235-238, 1999.

ROBINSON, R. K.; WILBEY, R. A. **Cheesemaking Practice**. 3. ed. NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1998. p. 48-51, 146-163.

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.

SHALABI, S. I.; FOX, P. F. Eletrophoretic analysis of cheese: comparison of methods. **Irish Journal of Food Science Technology**, v. 11, p. 135-151, 1987.

SHATA, H. M. A. Extraction of milk-clotting enzyme produced by solid state fermentation of *Aspergillus oryzae*. **Polish Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 241-247, 2005.

SILVA, A. T. **Maturação do queijo tipo Prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo**. 1998. 119p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, 1998.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Influence of the Coagulant Level on Early Proteolysis in Ovine Cheese-like Systems made with Sterilized Milk and *Cynara cardunculus*. **Journal of Food Science**, v. 69, n. 7, p. 579-584, 2004.

SILVA, S. V.; MALCATA, F. X. Studies pertaining to coagulant and proteolytic activities of plant proteases from *Cynara cardunculus*. **Food Chemistry**, v. 89, n. 1, p. 19-26, 2005.

SILVEIRA, G. G. et al. Microbial rennet produced by *Mucor miehi* in solid-state and submerged fermentation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 931-937, 2005.

SOUZA, M. C.; ROBERTO, I. C.; MILAGRES, A. M. F. Solid-state fermentation for xylanase production by *Thermoascus aurantiacus* using response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 768-772, 1999.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 169-172, 2005.

TRUJILLO, A. J. et al. Proteolytic activities of some milk clotting enzymes on ovine casein. **Food Chemistry**, v. 71, n. 4, p. 449-457, 2000.

TUBESHA, Z. A.; AL-DELAIFY, K. S. Rennin-like milk coagulant enzyme produced by a local isolate of *Mucor*. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 237-241, 2003.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553-1558, 2003.

VAIRO-CAVALLI, S. et al. Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 3, p. 271-275, 2005.

WANG, H. et al. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 169-173, 1998.

WILKINSON, M. G.; KILCAWLEY, K. N. Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 8, p. 817-830, 2005.

WIT, M. De. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 6, p. 606-616, 2005.

Capítulo III

Purificação e caracterização da metaloprotease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*

Purificação e caracterização da metaloprotease do fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*

Resumo

A importância das proteases em diversos setores industriais já é conhecida de longa data. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar a protease produzida pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* por fermentação em estado sólido (FES). A enzima foi purificada através de precipitação com álcool a 72% seguido de cromatografias em resinas Sephadex G75 e Sephacryl S100. Apresentou rendimento de 0,4% e um fator de purificação de 80 vezes. A massa molecular, estimada por SDS-PAGE, foi de 24,5 KDa. A protease foi inibida por EDTA (96,70%) e ativada por sulfato ferroso (197,25%), revelando-se uma metaloprotease ativada por ferro. Suas principais características bioquímicas foram pH ótimo a 5,5; temperatura ótima a 75°C e termoestabilidade superior a 70% da atividade quando tratada a 65°C por 1 hora. Foi ativada por Tween-20 (151,0%) e através dos estudos de cinética, mostrou preferência por caseína (k_m de 0,02 mM e V_{max} de 0,14 mM/min) do que por azocaseína (K_m de 0,14 mM e V_{max} de 0,18 mM/min).

III.1 Introdução

As proteases são comercialmente exploradas nas indústrias de detergente, alimentos, farmacêutica e química, como biocatalizadores com a função básica de hidrolisar proteínas (ANDRADE et al., 2002).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do mercado total de enzimas (KUMAR et al., 2005). Aquelas de origem microbiana estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e têm sido estudadas extensivamente (GUPTA et al., 2002). Fungos termofílicos são caracterizados por possuírem temperatura mínima de crescimento •20°C e temperatura máxima de crescimento •50°C e geralmente produzem enzimas com algumas características importantes como maior termoestabilidade, atividade ótima a temperaturas elevadas e altas taxas de hidrólise

(KALOGERIS et al., 2003). O emprego de enzimas termoestáveis, que promovem hidrólises a altas temperaturas, é vantajoso devido ao aumento da velocidade de reação e à redução na incidência de contaminação por microrganismos mesofílicos, contribuindo para o aumento da viabilidade técnica e econômica do processo (DA-SILVA et al., 2005), evidenciando a importância do estudo dessas enzimas.

Vários estudos descreveram a obtenção de proteases termoestáveis por bactérias (EL HADJ-ALI et al., 2006; JOHNVESLY; NAIK, 2001; JOHNVESLY; MANJUNATH; NAIK, 2002; SELLAMI-KAMOUN et al., 2006), porém são poucos e antigos os relatos de produção de proteases termoestáveis por fungos termofílicos (LI; YANG; SHEN, 1997; HASHIMOTO; IWAASA; YOKOTSUKA, 1972; ONG; GAUCHER, 1973).

Assim, este trabalho teve como objetivo estudar a purificação e caracterização de uma protease termoestável produzida pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* em fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo suplementado com de caseína como substratos.

III.2 Materiais e Métodos

III.2.1 Microrganismo

O fungo *Thermoascus aurantiacus*, obtido da coleção de fungos do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada – IBILCE – UNESP, foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250 mL inclinados contendo 50 mL do meio Sabouraud e cresceu em estufa a 50°C por dois dias. Após este período de crescimento ficou armazenado à temperatura ambiente.

III.2.2 Inóculo

A cada frasco contendo o fungo foi adicionado 100 mL de solução salina esterilizada, composta dos seguintes sais: sulfato de amônia $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$, sulfato de magnésio heptahidratado $(\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O})$ e nitrato de amônia (NH_4NO_3) , na concentração de 0,1% para cada

sal. A superfície do meio foi raspada delicadamente obtendo-se uma suspensão de micélios, que foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

III.2.3 Meios de fermentação, condições de cultura e extração enzimática

Foram preparados e esterilizados (120°C/40min), em frascos Erlenmeyer de 250 mL, meios contendo farelo de trigo com 5% de caseína, totalizando 5 g de substrato.

Os meios foram inoculados com 10,5 mL da suspensão micelial, obtendo-se assim 70% de umidade, e foram incubados a 45°C estacionariamente por 48 horas. Após o crescimento da cultura, 40 mL de água destilada foram adicionados aos meios para a extração enzimática. Os frascos foram agitados a 100 rpm / 30 minutos, o conteúdo foi filtrado e centrifugado a 15000 rpm / 20 minutos. A solução obtida, denominada extrato enzimático bruto, foi congelada e posteriormente utilizada para os ensaios enzimáticos.

III.2.4 Determinação da atividade proteolítica

Método com caseína - De acordo com Kembhavi; Kulkarni; Panti (1993), com modificações. A mistura da reação foi composta de 0,4 mL de caseína (Sigma) 0,5% (p/v) em tampão acetato 0,2 M pH 5,5 como substrato; 0,4 mL tampão acetato 0,2 M pH 5,5 e 0,2 mL de solução enzimática. A mistura de reação foi incubada a 60°C e ao final de 30 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1 mL de TCA 10%. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm/5 minutos e fez-se a leitura do sobrenadante a 280 nm. Preparou-se um controle, onde o TCA foi adicionado antes da solução enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 280 nm, nas condições do ensaio.

Método com azocaseína - De acordo com Germano et al. (2003), com modificações. A mistura de reação foi composta de 0,3 mL de azocaseína (Sigma) 1%; 0,15 mL de tampão MES 0,5 M pH 5,5 e 0,15 mL de solução enzimática. A mistura de reação foi incubada a 60°C e ao final de 20 minutos a reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de TCA

(10%). As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm/20min. Retirou-se 1,2 mL do sobrenadante adicionou-se 1,4 mL de NaOH 1 M e, após agitação, fez-se a leitura a 440 nm. Preparou-se um controle, onde o TCA foi adicionado antes da solução enzimática. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida arbitrariamente como a quantidade de enzima necessária para causar um aumento de 0,1 na absorbância a 440 nm, nas condições do ensaio.

A atividade específica foi expressa como unidades de atividade enzimática por mg de proteína.

III.2.5 Determinação de proteína

O conteúdo de proteína foi determinado pelo método de Hartree (1972), utilizando BSA como padrão.

III.2.6 Purificação da protease

Após alguns protocolos tentativos, o procedimento que resultou em melhor isolamento da protease é o descrito a seguir.

Concentração do extrato enzimático bruto

A concentração da protease bruta foi realizada através da precipitação protéica com álcool comercial (96%) a 72% (v/v). Esta solução foi deixada em repouso por aproximadamente 12 horas, a 5°C. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10000 rpm / 20 minutos, e o precipitado, ressuspensionado em tampão acetato 50 mM, pH 5,5.

Cromatografias de filtração em gel

A enzima concentrada foi submetida a cromatografia de filtração em gel utilizando resina Sephadex G75 (Pharmacia) em coluna aberta (100 m x 3 cm) da Pharmacia, contendo 600mL de resina equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,5 contendo NaCl 50 mM. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 0,3 mL/min. Amostras de 3,5 mL

do líquido eluído foram coletadas, em tubos, utilizando o coletor de frações 2110 Fraction Collector (Bio Rad).

A fração que apresentou atividade de protease foi concentrada em Centriprep (Millipore) com corte de 10 KDa e submetida a nova cromatografia de filtração em gel utilizando resina Sephacryl S100 (Sigma) em coluna aberta (65 cm x 2 cm) da Pharmacia, contendo 200mL de resina equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,5 contendo NaCl 0,2 M. A enzima foi eluída com o mesmo tampão, com um fluxo de 0,3 mL/min. Amostras de 3,5 mL do líquido eluído foram coletadas, em tubos, utilizando o coletor de frações 2110 Fraction Collector (Bio Rad).

III.2.7 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE)

As amostras coletadas das etapas de cromatografia foram analisadas por meio de SDS-PAGE, segundo Laemmli (1970). As proteínas foram desnaturadas por fervura a 100°C por 5 minutos em tampão de amostra composto por tris-HCl 0,1 M, pH 6,8, 2% de SDS, 10% de glicerol, DTT a 0,1M e azul de bromofenol a 0,001 M. O gel de corrida foi preparado na concentração de 12% e o gel de empilhamento na concentração de 4% como indicado em Sambrook e Russel (2001). Para a revelação do gel foi utilizado o método com reagente de prata de acordo com Blum et al. (1987).

III.2.8 Caracterização da enzima pura

Para esses estudos, empregou-se o ensaio descrito no item III.2.4 variando em cada caso o parâmetro que se desejava estudar, porém com algumas modificações. Utilizou-se solução de caseína 1% ou de azocaseína 1% e o tempo de reação foi de 20 minutos.

III.2.8.1 Determinação de pH e temperatura ótimos

Para determinação do pH ótimo, a atividade proteolítica foi avaliada a 60°C em diferentes valores de pH utilizando soluções tampão 50 mM: Acetato (3,6 a 5,0); Mes (5,5 a 7,0); Taps (7,5 a 9,0) e Caps (9,5 a 11,5).

A temperatura ótima da enzima foi determinada incubando-se a mistura da reação em diferentes temperaturas (35 a 85°C, com variação de 10°C) no pH determinado como ótimo.

III.2.8.2 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima foi avaliada de duas formas:

1) incubando-se a enzima sem o substrato em diferentes temperaturas (60 a 95°C, com variação de 5°C) por diferentes tempos (5, 10, 20, 40, 60, 120 e 270 minutos). Após a incubação a atividade proteolítica residual foi medida nas condições ótimas de pH e temperatura, e

2) incubando-se a enzima sem o substrato em diferentes temperaturas (60 a 95°C, com variação de 5°C) por uma hora em pH 5,5. Após o período de incubação a atividade proteolítica residual foi medida nas condições ótimas de pH e temperatura.

III.2.8.3 Efeito do NaCl na atividade proteolítica

Para determinar o efeito da concentração de NaCl na atividade proteolítica, realizou-se o ensaio enzimático utilizando azocaseína 1% ou caseína 1% no meio reacional com o sal em diferentes concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0%). A atividade enzimática foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência do sal e cuja atividade correspondeu a 100% de atividade.

III.2.8.4 Efeito de detergentes na atividade proteolítica

Para determinar o efeito de detergentes na atividade proteolítica, realizou-se o ensaio enzimático utilizando caseína 1% no meio reacional com o detergente (Triton X-100 ou Tween-20) nas respectivas concentrações (0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0%). A atividade enzimática foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência do detergente e cuja atividade correspondeu a 100% de atividade.

III.2.8.5 Efeito de sais na atividade proteolítica

À solução enzimática foram adicionados diferentes sais, incluindo cloretos de manganês, amônio, magnésio, potássio, bário, mercúrio, cálcio e cobre e sulfatos de cálcio, ferro, amônio, cobre, potássio e magnésio, a uma concentração final de 10 mM. As amostras foram incubadas a 60°C por 5 minutos e então adicionou-se o tampão Mes 50 mM pH 5,5 e a caseína 1% e a atividade enzimática residual foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência dos inibidores e cuja atividade corresponde a 100% de atividade.

III.2.8.6 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

Para classificar a protease, à solução enzimática foram adicionados diferentes inibidores específicos de protease incluindo inibidor de serino-proteases (PMSF e benzamidina), inibidor de metaloproteases (EDTA), inibidor de cisteíno-proteases (ácido iodoacético), a uma concentração final de 10 mM. As amostras foram incubadas a 60°C por 5 minutos e então adicionou-se o tampão Mes 50 mM pH 5,5 e a caseína 1% e a atividade enzimática residual foi determinada e comparada ao controle, que foi incubado na ausência dos inibidores e cuja atividade corresponde a 100% de atividade.

III.2.8.7 Cinética enzimática

Os valores para a constante de Michaelis (K_m) e para velocidade máxima (V_{max}) foram determinados pela medida da atividade proteolítica utilizando como substrato caseína e azocaseína em diferentes concentrações (0,25 a 6,0 mg/mL e 0,125 a 6,0 mg/mL, respectivamente) e a enzima a uma concentração constante (8,2 U/mL). Os parâmetros foram determinados através da regressão não linear, usando como modelo a equação descrita por Michaelis-Menten no programa GraFit 5.0 (LEATHERBARROW, 1992). A constante catalítica (K_{cat}), que representa o número de moléculas de substrato convertidos em produtos por segundo por molécula de enzima, foi determinada da seguinte maneira: $K_{cat} = V_{max} / [E] \times 1000 / 60$.

III.3 Resultados e Discussão

III.3.1 Purificação de uma protease a partir do extrato enzimático bruto

Para os estudos de purificação da enzima optou-se por produzir a enzima com farelo de trigo suplementado com 5% de caseína, já que, como mostrado no capítulo anterior, apresentou valor de atividade no segundo dia de fermentação próximo ao obtido a partir farelo suplementado com 20% de caseína (97,13 e 126,45 U/mL, respectivamente). A vantagem é se ter menor quantidade de proteína no extrato bruto interferindo menos nos procedimentos de purificação.

Uma das isoformas da protease produzida pelo fungo *T. aurantiacus* por fermentação em estado sólido foi isolada após três etapas de purificação.

Observa-se na Tabela 1 que a precipitação alcoólica foi eficiente como etapa inicial da purificação enzimática, devido ao aumento no fator de purificação.

Tabela 1. Precipitação alcoólica de protease de *T. aurantiacus* de meio de fermentação composto por farelo de trigo com 5% de caseína. Ao extrato enzimático foi adicionado álcool, em diferentes proporções e a suspensão foi deixada em repouso por aproximadamente 12 horas, a 5°C. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 10000 rpm / 20 minutos, e o precipitado, ressuspendido em tampão acetato 50 mM, pH 5,5.

Etapas	Atividade proteolítica	Proteína	Atividade específica	%	Fator de Purificação
	Total (U)	Total (mg)	(U/mg)		
Bruta	605,00	24,10	25,10	100	1
1:1	43,45	1,10	35,91	7,2	1,43
1:1,5	129,80	1,66	71,08	21,5	2,80
1:2	273,90	2,35	106,00	45,3	4,20
1:2,5	399,00	3,48	95,55	66,0	3,81
1:3	477,60	5,74	69,34	79,0	2,80

O método de precipitação utilizando solventes orgânicos também foi adotado para outras proteases fúngicas (CHAKRABARTI; MATSUMURA; RANU, 2000; HASHEM, 2000; TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERFEE, 2003).

A fração enzimática precipitada por álcool comercial (96%) a 72% (v/v), por apresentar resultados satisfatórios (aproximadamente 80% de rendimento e fator de purificação de aproximadamente 3 vezes), foi escolhida para ser submetida à cromatografia de filtração em gel. Testou-se cromatografias em colunas contendo Sephadex G75 e G50. Conforme apresentado na Figura 1-A, a melhor resolução foi proporcionada pela resina Sephadex G75, que separou o extrato bruto em 3 frações com atividades proteolíticas.

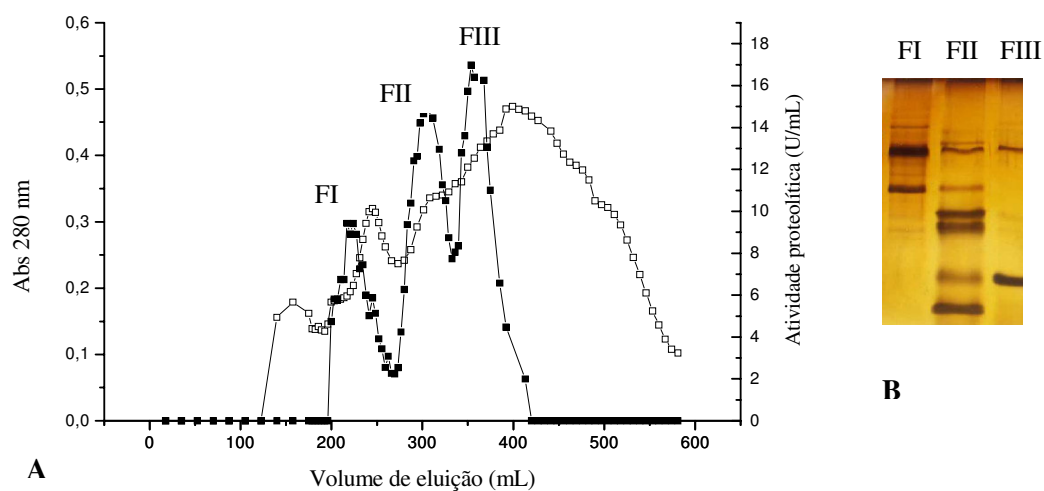


Figura 1. A - Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephadex G75. Abs 280 nm (●) e atividade proteolítica (●). B - SDS-PAGE 12% das frações coletadas após filtração em gel na resina Sephadex G75.

A terceira fração (FIII), por apresentar maior atividade enzimática e menor conteúdo protéico, conforme visualizado com SDS-PAGE (Figura 1-B), foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Esta fração foi então submetida à cromatografia de filtração em gel em resina Sephacryl S100, cujo perfil de eluição está apresentado na Figura 2. Percebe-se a presença de apenas um pico de atividade proteolítica.

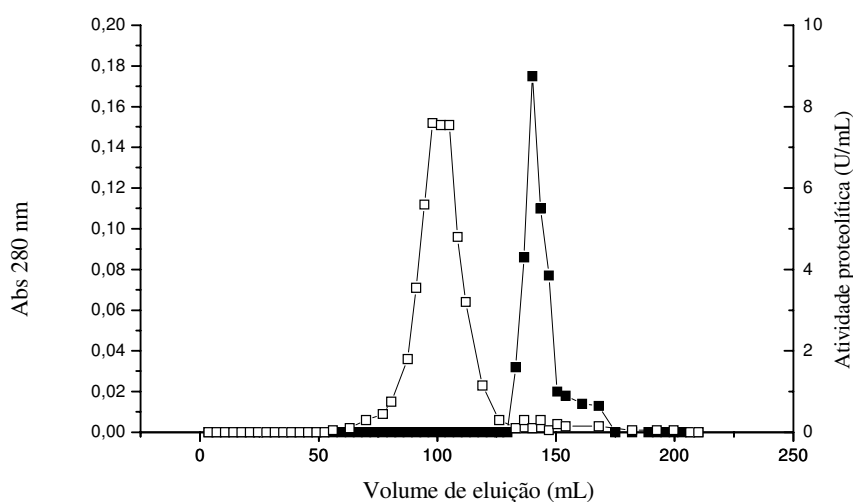


Figura 2. Perfil de eluição da protease na cromatografia de filtração em gel na resina Sephacryl S100. Abs 280 nm (●) e atividade proteolítica (●).

A pureza da amostra coletada após a cromatografia de filtração em gel na resina Sephacryl S100 pode ser confirmado no SDS-PAGE apresentado na Figura 3, onde é possível observar uma única banda protéica presente na fração III.

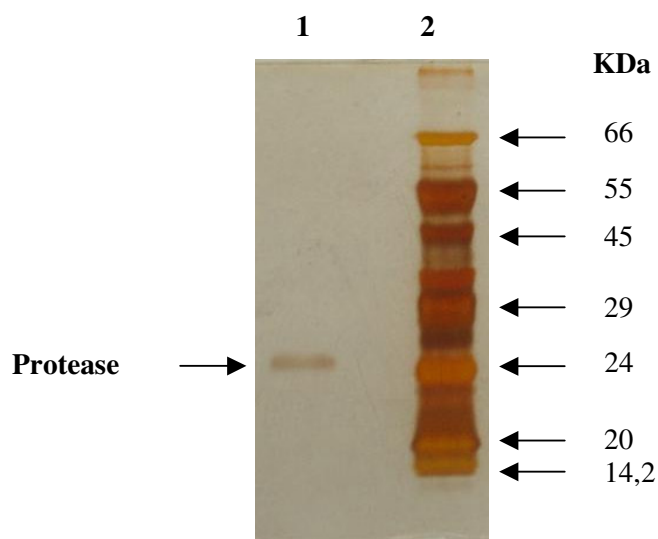


Figura 3. SDS-PAGE 12% da protease de *T. aurantiacus* após a purificação. Coluna 1, amostra coletada após filtração em gel em resina Sephacryl S100 e Coluna 2, marcadores de massa molecular: BSA, 66 KDa; albumina, 55 KDa; ovoalbumina, 45 KDa; gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 36 KDa; anidrase carbônica, 29 KDa; tripsinogênio, 24 KDa; inibidor de tripsina, 20 KDa; Ó-lactoalbumina, 14,2 KDa.

A massa molecular da protease foi estimada em 24,5 KDa pela análise do gráfico apresentado na Figura 4. Conhecendo-se o valor de R_f da protease (0,508 cm), encontrou-se o valor do logaritmo da massa molecular (1,3885) e consequentemente determinou-se o valor da massa molecular.

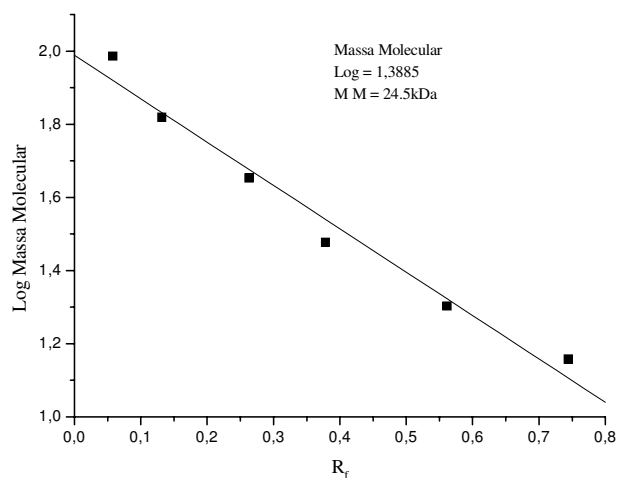


Figura 4. Curva padrão para determinação da massa molecular da protease através dos valores de cada massa molecular das proteínas do marcador e de R_f , onde R_f = distância percorrida por cada proteína do marcador / distancia total de corrida, obtidos de SDS-PAGE 15% (não mostrado).

O protocolo estabelecido para a purificação da protease-TA apresentou rendimento de 0,4% e fator de purificação de 79,5 vezes (Tabela 2). O baixo rendimento pode ser explicado pela separação inicial da atividade proteolítica total em 3 frações distintas de atividade proteolítica. Isso significou uma menor quantidade de enzima na etapa cromatográfica seguinte.

Tabela 2. Resultados obtidos a partir dos processos de purificação da protease do extrato enzimático de *T. aurantiacus*.

Etapas	Atividade proteolítica Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	%	Fator de Purificação
Bruta	13288,00	457,60	29,04	100	1
Precipitação	7321,56	76,15	96,15	55,1	3,30
F III Sephadex G75	1593,90	7,70	207,00	12,0	7,13
Sephacryl S100	46,20	0,02	2310,00	0,4	79,5

Há relatos de purificação de proteases fúngicas através do uso de procedimentos tradicionais que envolvem técnicas de precipitação e cromatografia e a baixa massa molecular apresentada pela protease está de acordo com vários relatos nos quais as proteases fúngicas geralmente são menores que 50 KDa (BARATA et al., 2002; CHAKRABARTI;

MATSUMURA; RANU, 2000; CHELLAPPAN et al., 2006; HASHIMOTO; IWAASA; YOKOTSUKA, 1973; HATTORI et al., 2005). Diferentemente de outros autores, o protocolo de purificação que conseguimos não necessitou emprego de cromatografia de troca iônica. Isto foi possível porque provavelmente as frações apresentaram pesos moleculares bem distintos, permitindo a separação em processos de filtração em gel.

III.3.2 Caracterização da enzima pura

Uma vez purificada a enzima procedeu-se sua caracterização bioquímica.

III.3.2.1 Determinação de pH e temperatura ótimos

A Figura 5 mostra o efeito do pH na atividade proteolítica. No ensaio realizado com caseína, nota-se atividade máxima em pH 5,5 e 10,5. Esse valor alto em pH alcalino ocorre, provavelmente, devido ao fato de a caseína, por ser um substrato protéico, também sofrer alguma modificação com a variação do pH e afetar sua interação com a enzima. Quando se realizou o ensaio com azocaseína, isso não ocorre, e confirma-se o valor do pH ótimo da enzima em 5,5. É interessante observar que em pH 7,0, no ensaio realizado com azocaseína, a enzima ainda apresenta 59% de atividade, ou seja, é bastante ativa em pH levemente alcalino.

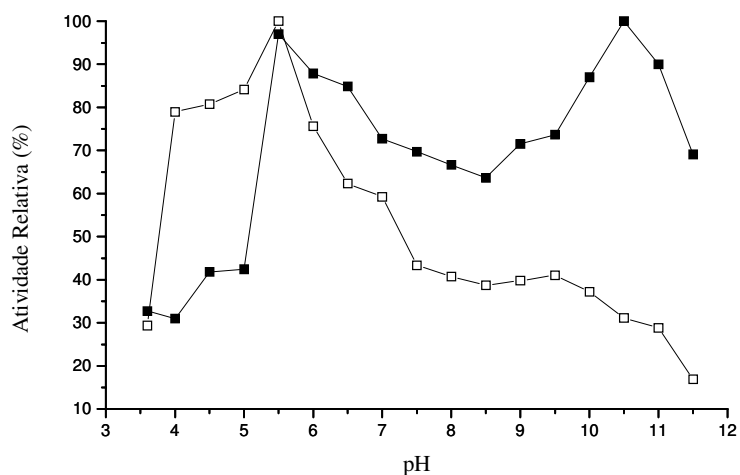


Figura 5. Efeito do pH na atividade da protease. Ensaio realizado utilizando azocaseína 1% (●) ou caseína 1% (□) em vários tempos (Acetato pH 3,6 a 5,0; Mes pH 5,5 a 7,0; Taps pH 7,5 a 9,0 e Caps 9,5 a 11,5) no meio reacional. A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao maior valor de atividade obtido no ensaio.

Processos biotecnológicos conduzidos a temperaturas elevadas apresentam a vantagem de diminuir o risco de contaminação por mesófilos, proporcionam maior taxa de reação devido à diminuição da viscosidade e aumento no coeficiente de difusão de substratos além de rendimentos de processos mais altos devido ao aumento da solubilidade de substratos e produtos (HAKI; RAKSHIT, 2003). Por isso enzimas de microrganismos termofílicos têm ganhado interesse industrial e biotecnológico, pois são adequadas para aplicação em processos realizados a altas temperaturas.

A Figura 6 mostra o efeito da temperatura na atividade proteolítica. Percebe-se que a enzima atinge atividade máxima a 75°C e que possui mais de 50% de atividade a 55 e 85°C, mostrando-se altamente termofílica.

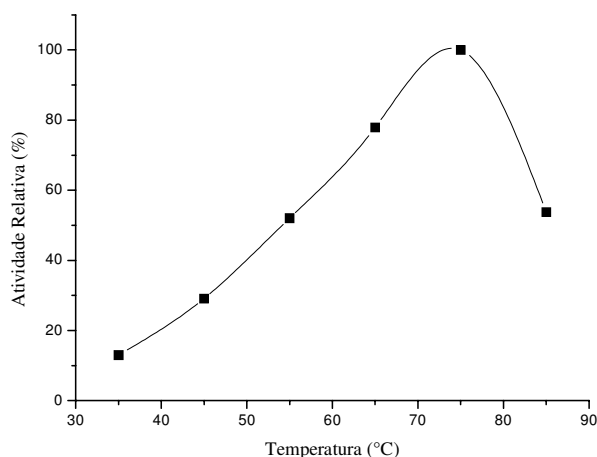


Figura 6. Efeito da temperatura na atividade da protease. Ensaio realizado através da medida da atividade enzimática em cada temperatura, em pH 5,5 utilizando caseína 1% no meio reacional. A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao maior valor de atividade obtido no ensaio.

A temperatura ótima da protease de *T. aurantiacus* é extremamente alta quando comparado a outras proteases fúngicas. No trabalho de Chellappan et al. (2006) a protease obtida de *Engyodontium album* BTMFS10 apresentou máxima atividade a 60°C. No trabalho de Barata et al. (2002) a protease obtida de *Fusarium oxysporum* var. *lini* apresentou máxima atividade a 45°C. No trabalho de Dienes et al. (2006) a protease obtida de *Trichoderma reesei* QM9414 apresentou máxima atividade a 50°C. Nos trabalhos de Tunga; Shrivastava; Banerjee (2003) e Wang et al. (2005) as proteases obtidas de *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente, apresentaram máxima atividade a 40°C. No trabalho de Liang et al. (2006) a protease obtida de *Monascus purpureus* CCRC31499 apresentou máxima atividade a 40°C. No trabalho de Chakrabarti; Matsumura; Ranu (2000) a protease obtida de *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) apresentou máxima atividade a 37°C. Entretanto, enzimas de fungos termofílicos apresentam atividade máxima a elevadas temperaturas como 70°C para a protease no extrato bruto de *Thermomyces lanuginosus* (LI; YANG; SHEN, 1997) e 75°C em pH 4,6 para a protease de *Penicillium duponti* K1014 (HASHIMOTO; IWAASA; YOKOTSUKA, 1973).

III.3.2.2 Estabilidade térmica

A Figura 7 mostra a estabilidade da enzima na ausência do substrato em diferentes temperaturas e por diferentes tempos. Nota-se que a 60 e 65°C a enzima apresenta aproximadamente 70% de atividade após 3 horas de incubação. Percebe-se ainda que a enzima conservou mais da metade de sua atividade por 10 minutos a 80°C, por 1 hora a 75°C e por 2 horas a 70°C. Temperaturas maiores que 85°C provocaram mais de 75% de perda na atividade enzimática.

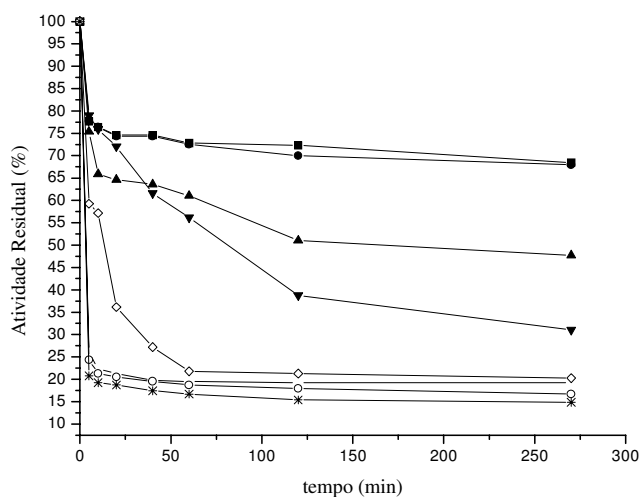


Figura 7. Efeito da temperatura na desnaturação da protease. Ensaio realizado incubando-se a enzima em diferentes temperaturas (60°C ●, 65°C ◐, 70°C ◑, 75°C ◒, 80°C ◓, 85°C ↔, 90°C ◔, 95°C ∇) durante diferentes tempos (5, 10, 20, 40, 60, 120 e 270 min) e medindo-se a atividade residual a 60°C, utilizando caseína 1% no meio reacional. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao maior valor de atividade obtido no ensaio.

A Figura 8 mostra a estabilidade da enzima em diferentes temperaturas por 1 hora. A enzima apresentou mais de 70% de estabilidade até 65°C e 56,15% até 75°C por 1 hora.

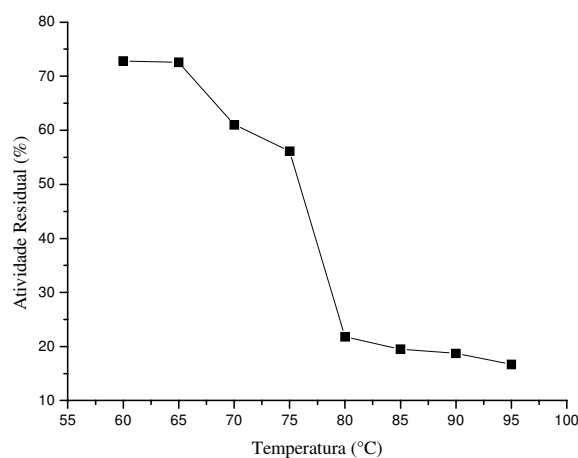


Figura 8. Efeito da temperatura na estabilidade da protease. Ensaio realizado incubando-se a enzima por 1 hora em cada temperatura e medindo-se a atividade residual a 60°C, utilizando caseína 1% no meio reacional. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao maior valor de atividade obtido no ensaio.

A alta termoestabilidade da protease condiz com relatos de outras enzimas secretadas pelo *Thermoascus aurantiacus* como, por exemplo, catalase, 100% estável até 80°C por 1 hora (WANG et al., 1998); β -mannosidase, 50% estável a 76°C por 10 minutos (GOMES et al., 2006); oxidase, 100% estável a 60°C por 15 minutos (KO et al., 2005); endoglucanase, 100% estável a 50°C por 48 horas (PARRY et al., 2002); xilanase, 100% estável a 60°C por 1 hora (DA SILVA et al., 2005).

A enzima apresentou-se mais termoestável que as proteases de *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2), que manteve 60% de sua atividade a 60°C (CHAKRABARTI; MATSUMURA; RANU, 2000), de *Aspergillus parasiticus*, que manteve somente 40% de sua atividade a 70°C (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERFEE, 2003), de *Aspergillus fumigatus*, que foi completamente inativada a 70°C (WANG et al. 2005).

Resultados semelhantes de alta termoestabilidade são geralmente obtidos para proteases de bactérias como *Bacillus* sp. JB-99 (JOHNVESLY; MANJUNATH; NAIK, 2002) que exibiu 63% de atividade a 70°C, *Bacillus licheniformis* NH1 (HADJ-ALI et al. 2006) que manteve 100% de atividade a 60°C na presença de CaCl_2 , *Bacillus stearothermophilus* TLS33 (SOOKKHEO et al., 2000) que apresentou pouco mais de 60% de atividade a 70°C, *Bacillus* sp SMIA-2 (NASCIMENTO; MARTINS, 2006) cuja protease no extrato bruto apresentou aproximadamente 80% de atividade a 70°C, *Thermoplasma volcanium* (KOCABIYIK; ÖZEL, 2007) cuja protease no extrato bruto manteve 100% de atividade até 70°C. Outros fungos termofílicos como *Thermomyces lanuginosus* (LI; YANG; SHEN, 1997) e

Malbranchea pulchella var. *sulfurea* (ONG; GAUCHER, 1976) também produzem proteases com alta termoestabilidade: aproximadamente 70% de atividade a 60°C para a enzima no extrato bruto e 50% de atividade a 73°C, respectivamente.

III.3.2.3 Efeito do NaCl na atividade proteolítica

A Figura 9 mostra o efeito do cloreto de sódio na atividade enzimática. Observa-se que a enzima manteve-se altamente ativa com concentrações até 0,4% e conservou mais da metade de sua atividade na presença de NaCl 1%. Após essa concentração houve perda de atividade, ou seja, a elevação da força iônica, principalmente acima de 1%, provocou efeito inibitório da atividade enzimática.

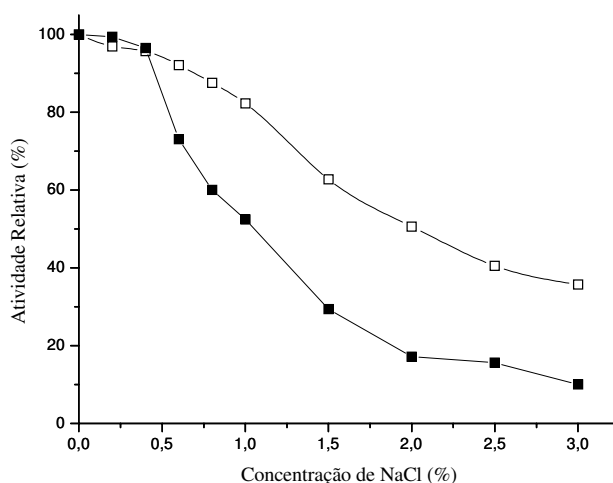


Figura 9. Efeito da concentração de NaCl na atividade da protease. Ensaio realizado utilizando azocaseína 1% (●) ou caseína 1% (□) no meio reacional com os dados nas respectivas concentrações (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 e 3,0). A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao maior valor de atividade obtido no ensaio.

III.3.2.4 Efeito de detergentes na atividade proteolítica

O Triton X-100 e o Tween-20 são surfactantes não iônicos utilizados em formulações de detergentes. A Figura 10 mostra o efeito dos detergentes Triton X-100 e Tween-20 na

atividade enzimática. Até 0,1% de Triton X-100, a enzima apresenta-se 64% ativa, quando eleva-se a concentração do detergente, há uma queda na atividade até tornar-se completamente inativa em concentrações maiores que 0,4%. Esse comportamento é diferente do observado para a protease de *Aspergillus parasiticus*, no trabalho de Tunga; Shrivastava; Banerjee (2003), a qual mantém 95% de atividade na presença de 2% do detergente. Já na presença de Tween-20, há uma pequena queda de atividade até a concentração de 0,2% seguido de um aumento expressivo até 1%, com 151,0% de atividade relativa. Resultado similar foi obtido por Moreira et al. (2002), durante estudos com protease de *Nocardiopsis* sp., a qual se mostrou 129% ativa na presença do detergente.

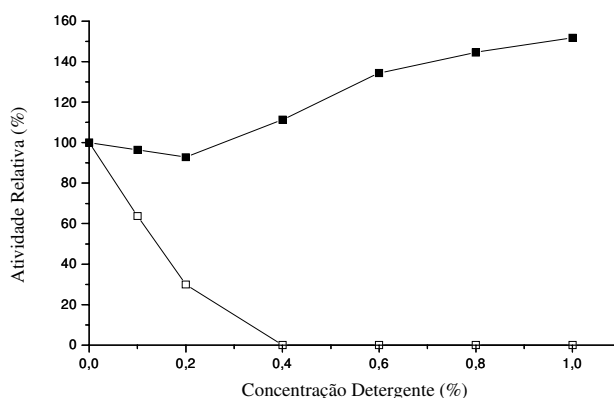


Figura 10. Efeito da concentração de detergentes na atividade da protease. Ensaio realizado utilizando caseína 1% no meio reacional com os detergentes nas respectivas concentrações (0; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0), Triton X-100 (●) e Tween-20 (○). A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado com ausência do detergente.

Comportamento similar em relação à presença dos surfactantes, ou seja, diminuição da atividade por Triton X-100 e aumento da atividade por Tween-20, também foi encontrado para a protease de *Clonostachys rosea* (LI et al., 2006), a qual sofreu 36,5% de inibição por Triton X-100 e 16% de ativação por Tween-20.

A atividade da protease em altos valores de temperatura, em valores de pH levemente alcalinos e na presença de Tween-20 sugere a viabilidade da enzima para aplicação na indústria de detergentes.

III.3.2.5 Efeito de sais na atividade proteolítica

A Tabela 3 mostra o efeito de diferentes sais, na forma de sais cloretos ou sulfatos, na atividade proteolítica. É notável a elevada estimulação da atividade enzimática na presença de sulfato ferroso, principalmente em concentrações crescentes (Figura 11), indicando que a protease-TA é uma protease ativada por ferro. Esse comportamento (ativação por ferro) também foi encontrado para a metaloprotease de *Bacillus subtilis* FP-133 estudada por Setyorini et al. (2006), que apresentou 121% de atividade residual na presença de Fe^{2+} .

Tabela 3. Efeito de sais (10 mM) na atividade da protease. Ensaio realizado incubando-se a enzima por 5 minutos com cada sal e medindo-se a atividade residual a 60°C, utilizando caseína 1% no meio reacional. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de sais.

Sais	Atividade Residual (%)
Controle	100,00
MnCl_2	86,67
NH_3Cl	89,41
MgCl_2	92,94
KCl	89,02
BaCl_2	94,12
HgCl_2	5,49
CaCl_2	89,80
CuCl_2	57,65
CaSO_4	96,86
FeSO_4	197,25
NH_3SO_4	96,86
MnSO_4	100,78
CuSO_4	51,76
K_2SO_4	90,20
MgSO_4	94,90

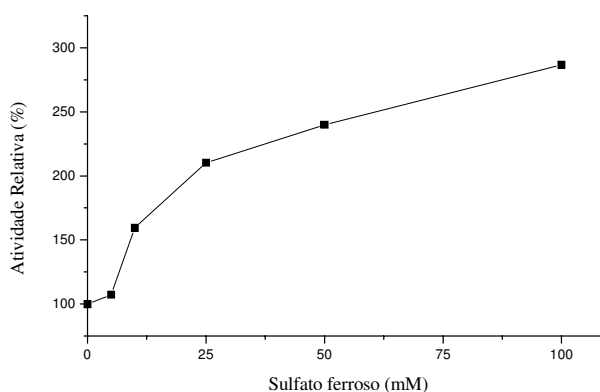


Figura 11. Efeito da concentração de sulfato ferroso na atividade da protease. Ensaio realizado utilizando caseína 1% no meio reacional com o sulfato nas respectivas concentrações (0,5, 10, 25, 50, 100 mM). A atividade relativa representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado na ausência do sulfato.

Metais pesados, como o mercúrio, têm alta afinidade por grupos sulfidrílicos, assim a forte inibição da atividade enzimática por este íon (94,5%, Tabela 3) pode indicar a importância desse grupo durante a catálise. Foi constatado também que o agente redutor DTT, a 10 mM, não inibiu a atividade enzimática, sustentando a hipótese da importância de grupos –SH para a atividade da protease. No trabalho de Ramírez-Zavala et al. (2004) também foi sugerido a participação de um grupo –SH no sítio catalítico ou nas suas proximidades da metaloprotease de *Kluyveromyces marxianus*, devido à inibição parcial por E-64, agente bloqueador de grupos sulfidrílicos.

III.3.2.6 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

A Tabela 4 mostra a susceptibilidade da enzima à inibidores de serino-proteases (PMSF; benzamidina), metaloproteases (EDTA) e cisteíno-proteases (ácido iodoacético). A enzima foi fortemente inibida por EDTA, apresentando-se então como uma metaloprotease.

Tabela 4. Efeito de inibidores de protease (10 mM) na atividade da protease. Ensaio realizado incubando-se a enzima por 5 minutos com cada inibidor e medindo-se a atividade residual a 60°C, utilizando caseína 1% no meio reacional. A atividade residual representa a porcentagem de atividade observada com relação ao valor de atividade obtido no ensaio realizado sem adição de inibidores.

Inibidores	Atividade Residual (%)	Classe de enzimas inibidas
Controle (sem inibidor)	100,00	
PMSF	96,70	Serino
Benzamidina	100,00	Serino
EDTA	3,30	Melato
Ácido iodoacético	96,28	Cisteíno

As proteases dos fungos *Armillaria mellea* estudada no trabalho de Lee et al. (2005), *Aspergillus oryzae* NRRL 2217 estudada por Sumantha et al. (2005), e *Aspergillus fumigatus* estudada por Monod et al., 1993 também se apresentaram como metaloproteases. Entretanto, esse comportamento geralmente é observado em proteases produzidas por bactérias como *Bacillus stearothermophilus* TLS33 (SOOKKHEO et al., 2000), *Aeromonas caviae* (NAKASONE et al., 2004), *Salinivibrio* sp. AF-2004 (AMOOZEGAR et al., 2006), *Serratia marcescens* (ROMERO et al., 2001) e *Bacillus polymyxa* B-17 (MATTA; PUNJ, 1998).

Outras proteases fúngicas foram classificadas como serino-proteases, obtidas de *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* (ONG; GAUCHER, 1976) *Penicillium charlesii* (ABBAS; GROVES; GANDER, 1989), *Aspergillus parasiticus* (TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003), *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2) (CHAKRABARTI; MATSUMURA; RANU, 2000), *Clonostachys rosea* (LI et al., 2006), *Trichoderma reesei* QM9414 (DIENES et al., 2006), *Fusarium oxysporum* var. *lini* (BARATA et al. 2002), *Cordyceps militaris* (HATTORI et al., 2005) sendo as 3 últimas proteases semelhantes à tripsina; e cisteíno-proteases, obtidas de *Humicola lanuginosa* (SHENOLIKAR; STEVENSON, 1982).

III.3.2.7 Cinética enzimática

Os valores para a constante de Michaelis (k_m) e para velocidade máxima (V_{max}) de uma enzima são determinados pela medida das velocidades iniciais para várias concentrações de substrato.

Os resultados obtidos das análises de cinética enzimática podem ser observados nas Figuras 12, 13, 14 e 15 e nas Tabelas 5 e 6.

Utilizando o programa GraFit 5.0 (LEATHERBARROW, 1992) os gráficos apresentados nas Figuras 12 e 13 foram obtidos.

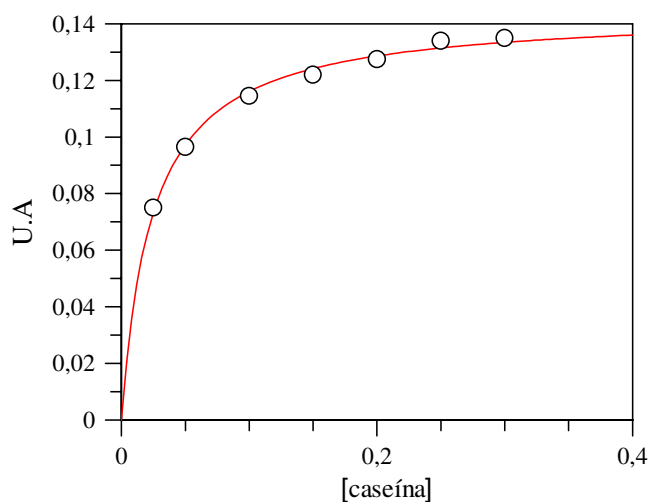


Figura 12. Efeito da concentração de caseína na velocidade de reação: curva de Michaelis-Menten, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min.}$

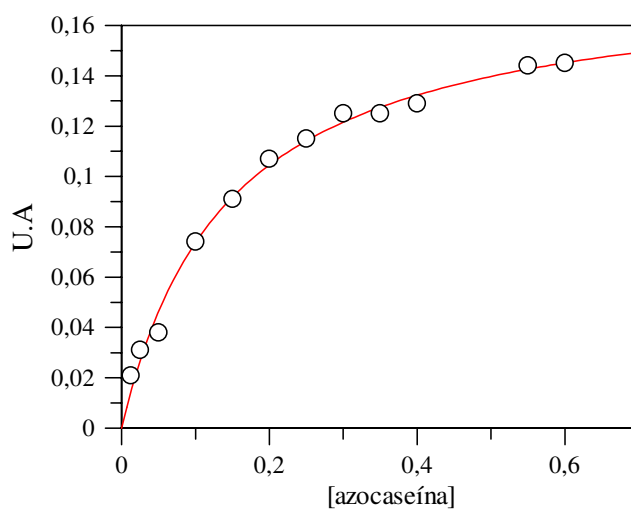


Figura 13. Efeito da concentração de azocaseína na velocidade de reação: curva de Michaelis-Menten, onde $U.A. = \Delta Abs_{280\text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min.}$

Quando se utilizou caseína como substrato, valores para k_m de 0,02 mM, para V_{max} de 0,14 mM/min e para a constante de especificidade (K_{cat} / K_m) de 12,07 mM⁻¹ s⁻¹ foram obtidos. Quando utilizada azocaseína, obteve-se K_m de 0,14 mM, V_{max} de 0,18 mM/min e K_{cat} / K_m de 2,53 mM⁻¹ s⁻¹ (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros cinéticos da protease utilizando caseína e azocaseína como substratos.

Resultados obtidos através da regressão não linear dos dados, usando como modelo a equação descrita por Michaelis-Menten no programa GraFit 5.0.

Substrato	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	K_{cat} / K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Caseína	0,14	0,02	12,07
Azocaseína	0,18	0,14	2,53

Os erros foram mantidos abaixo de 10%.

O maior valor de K_m e o menor valor de K_{cat} / K_m para reação com azocaseína indica menor afinidade de ligação desse substrato com a enzima, quando comparado com a caseína. Ou seja, a enzima necessita de menores concentrações de caseína para atingir máxima eficiência catalítica. Isto também pode ter ocorrido porque a protease age com baixa especificidade e na molécula de caseína há mais sítios de clivagem. No substrato azocaseína a quantificação da atividade é baseada apenas na hidrólise da ligação entre o cromóforo e a caseína.

Em concentrações de caseína maiores que 3,5 mg/mL houve queda da atividade enzimática, provavelmente devido à inibição pela alta concentração do substrato, que pode ter se ligado à enzima numa orientação incorreta (BARATA et al., 2002).

No trabalho de Chakrabarti; Matsumura; Ranu (2000) o valor de K_m para reação da protease de *A. terreus* (IJIRA 6.2) com caseína foi de 0,055 mM, ou seja, mostrou-se ligeiramente menos eficiente para esta reação do que a protease de *T. aurantiacus*.

Os mesmos dados foram plotados utilizando o duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, e os gráficos apresentados nas Figuras 13 e 14 foram obtidos. Essa representação gráfica fornece uma linha reta e o ponto onde essa linha intercepta a ordenada é igual a $1/V_{max}$, o ponto de intersecção na abscissa é igual a $-1/K_m$ e a inclinação da reta é igual a K_m/V_{max} . Assim, tem-se a seguinte equação de reta: $y = 1/V_{max} + (K_m/V_{max})x$.

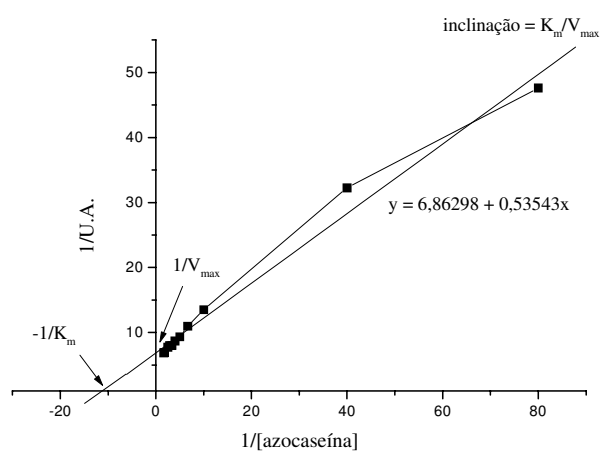


Figura 14. Efeito da concentração de azocaseína na velocidade de reação: duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde $U.A. = \text{Abs}_{280 \text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$.

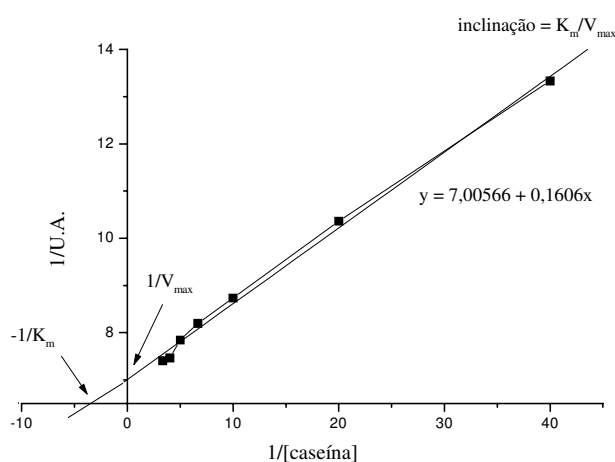


Figura 15. Efeito da concentração de caseína na velocidade de reação: duplo-recíproco de Lineweaver-Burk, onde $U.A. = \text{Abs}_{280 \text{ nm}} \times 10 / 20 \text{ min}$.

Quando se utilizou caseína como substrato, valores para k_m de 0,02 mM, para $V_{\max}$ de 0,14 mM/min e para a constante de especificidade (K_{cat} / K_m) de $12,67 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ foram obtidos. Quando utilizada azocaseína, obteve-se K_m de 0,08 mM, $V_{\max}$ de 0,15 mM/min e K_{cat} / K_m de $3,80 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tabela 6).

Tabela 6. Parâmetros cinéticos da protease utilizando caseína e azocaseína como substratos. Resultados obtidos pela regressão linear dos dados, analisados pelo gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk.

Substrato	$V_{\max}$ (mM/min)	K_m (mM)	K_{cat} / K_m (mM ⁻¹ s ⁻¹)
Caseína	0,14	0,02	12,67
Azocaseína	0,15	0,08	3,80

Os erros foram mantidos abaixo de 10%.

O gráfico de duplo-recíproco de Lineweaver-Burk representa graficamente a transformação da equação de Michaelis-Menten ($V = V_{\max}[S] / K_m + [S]$), descrita por uma curva hiperbólica, em uma equação de reta, tomando-se os recíprocos dos dois lados da equação. A análise dos dados pelo gráfico de Lineweaver-Burk é bastante utilizada (BARATA et al., 2002, MATTA; PUNJ, 1998, CHAKRABARTI; MATSUMURA; RANU, 2000, KUMAR et al. 2005) por ser considerado mais fácil desenhar uma reta através de uma série de pontos, do que estimar o melhor encaixe dos pontos de uma curva (CAMPBELL, 2000). Porém percebe-se que existe uma pequena diferença nos valores encontrados nessa análise, principalmente quando utilizada azocaseína como substrato, quando comparada aos resultados obtidos pelo programa GraFit, que utiliza a equação de Michaelis-Menten. Assim, é preferível utilizar a equação hiperbólica de Michaelis-Menten do que sua transformação em uma equação de reta para encontrar os parâmetros cinéticos de uma enzima. Para isso, métodos computacionais que contam com a adequação de uma hipérbole para traçar o gráfico de $V \times [S]$ sem qualquer transformação linear, têm sido adotados (POLGÁR, 1989).

III.4 Conclusões

Através das técnicas de precipitação e cromatografia de filtração em gel foi possível realizar a purificação da protease do extrato enzimático bruto e estimar que a enzima tenha massa molecular de aproximadamente 24,5 KDa.

A enzima pura apresentou como principais características:

- Atividade ótima a 75°C e em pH 5,5;
- 70% de estabilidade até 65°C e 56,15% até 75°C por 1 hora;
- 151,0% de atividade relativa na presença de Tween-20;
- Inibição por EDTA e ativação por sulfato ferroso, revelando-se uma metaloprotease ativada por ferro;
- Inibição por cloreto de mercúrio, sugerindo a importância de grupos –SH durante a catálise;
- Maior afinidade por caseína do que por azocaseína;

III.5 Referências Bibliográficas

ABBAS, C. A.; GROVES, S.; GANDER, J. E. Isolation, purification, and properties of *Penicillium charlesii* alkaline protease, **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 10, p. 5630-5637, 1989.

AMOOZEGAR, M. A. et al. Production of an extracellular alkaline metalloprotease from a newly isolated, moderately halophile, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004, **Microbiological Research**, In Press, 2006.

ANDRADE, V. S. et al. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 106-110, 2002.

BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. *lini*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 304-308, 2002.

BLUM, H.; BIER, H.; GROSS, H. J. Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Eletrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. p. 167-173.

CHAKRABARTI, S. K.; MATSUMURA, N.; RANU, R. S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). **Current Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 239-244, 2000.

CHELLAPPAN, C. S. et al. Production, purification and partial characterization of a novel protease from marine *Engyodontium album* BTMFS10 under solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 956-961, 2006.

DA-SILVA, R. et al. Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* miehe. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 3, p.235-241, 2005.

DIENES, D. et al. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, In Press, 2006.

EL HADJ-ALI, N.; AGREBI, R.; GHORBEL-FRIKHA, B. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, In Press, 2006.

GERMANO et al. Characterization and stability of protease from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 2-3, p. 246-251, 2003.

GOMES, J. et al. Production of thermostable β -mannosidase by a strain of *Thermoascus aurantiacus*: isolation, partial purification and characterization of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, In Press, 2006.

GUPTA, R. et al. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

HADJ-ALI, N. E. et al. Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, In Press, 2006.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 17-34, 2003.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HASHEM, A. M. Purification and properties of a milk-clotting enzymes produced by *Penicillium oxalicum*. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 3, p. 219-222, 2000.

HASHIMOTO, H.; IWAASA, T.; YOKOTSUKA, T. Thermostable acid protease produced by *Penicillium duponti* K1014, a true thermophilic fungus newly isolated from compost. **Applied Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 986-992, 1972.

HASHIMOTO, H.; IWAASA, T.; YOKOTSUKA, T. Some properties of acid protease from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K1014, **Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 578-583, 1973.

HATTORI, M. et al. Extracellular trypsin-like proteases produced by *Cordyceps militaris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 631-636, 2005.

JOHNVESLY, B.; MANJUNATH, B. R.; NAIK, G. R. Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 61-64, 2002.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 2, p. 139–144, 2001.

KALOGERIS, E. et al. Production and characterization of cellulolytic enzymes from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* under solid state cultivation of agricultural wastes. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 7, p. 1099-1104, 2003.

KEMBHAVI, A. A.; KULKARNI, A.; PANT, A. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM N° 64. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 38, n. 1-2, p. 83-92, 1993.

KO, H-S. et al. Purification and characterization of intracellular and extracellular, thermostable and alkali-tolerant alcohol oxidases produced by a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus* NBRC 31693. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 348-353, 2005.

KOCABIYIK, S.; ÖZEL, H. An extracellular – pepstatin insensitive acid protease produced by *Thermoplasma volcanium*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 1, p. 112-117, 2007.

KUMAR, S. et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEATHERBARROW, R. J. Grafit Version 5.0. Staines, UK: Erithacus Software Ltd., 1992.

LEE, S.-Y. et al. Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. **Protein Expression and Purification**, v. 43, n; 1. p. 10-17, 2005.

LI, D.C.; YANG, Y. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, v. 101, n. 1, p. 18-22, 1997.

LI, J. et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 925–929, 2006.

LIANG, T. Purification and characterization of a protease extracellularly produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 74-80, 2006.

MATTA, H.; PUNJ, V. Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 139-145, 1998.

MONOD, M. et al. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 10, p. 4099-4104, 1993.

MOREIRA, K. A. Application of protease from *Nocardiopsis* sp. as a laundry detergent additive. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 307-312, 2002.

NAKASONE, N. et al. Purification and characterization of a novel metalloprotease isolated from *Aeromonas caviae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 237, n. 1, p. 127-132, 2004.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.

ONG, P. S.; GAUCHER, G. M. Production, purification and characterization of thermomycolase, the extracellular serine protease of the thermophilic fungus *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 22, n. 2, p. 165-176, 1976.

ONG, P. S.; GAUCHER, G. M. Protease production by thermophilic fungi. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 129-133, 1973.

PARRY, N. J. et al. Biochemical characterization and mode of action of a thermostable endoglucanase purified from *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 404, n. 2, p. 243-253, 2002.

POLGÁR, L. **Mechanisms of Protease Action**. Florida: CRC Press, Inc., 1989. p. 68-70.

ROMERO, F. J. et al. Production, purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 6, p. 507-515, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3. ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SELLAMI-KAMOUN, A. et al. Stability of thermostable alkaline protease from *Bacillus licheniformis* RP1 in commercial solid laundry detergent formulations. **Microbiological Research**, In Press, 2006.

SETYORINI, E. et al. Purification and characterization of two novel halotolerant extracellular proteases from *Bacillus subtilis* strain FP-133. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 433-440, 2006.

SHENOLIKAR, S.; STEVENSON, K. J. Purification and partial characterization of a thiol proteinases from the thermophilic fungus *Humicola lanuginosa*. **Biochemistry Journal**, v. 205, n. 1, p. 147-152, 1982.

SOOKKHEO, B. et al. Purification and characterization of the highly thermostable protease from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. **Protein Expression and Purification**, v. 20, n. 2, p. 142-151, 2000.

SUMANTHA, A. et al. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 4, p. 313-319, 2005.

TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1553-1558, 2003.

WANG, H. et al. Purification and characterization of a thermostable catalase from culture broth of *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 2, p. 169-173, 1998.

WANG, S. et al. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 660-665, 2005.

CONCLUSÃO

O Brasil, devido a sua flora diversificada e pela abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas), é fonte de importantes microrganismos que podem produzir proteases com propriedades de interesse industrial. Este estudo mostrou a possibilidade de produzir uma protease pelo fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus* através de fermentação em estado sólido utilizando farelo de trigo, resíduo agroindustrial de baixo custo, suplementado com caseína.

A protease no extrato enzimático bruto apresentou comportamento proteolítico muito diferente de uma renina microbiana recombinante devido à hidrólise excessiva das caseínas do leite, evidenciando a ação proteolítica generalizada da enzima e sua baixa especificidade. Sugerem-se estudos para verificar a atuação da protease adicionada a queijos como ferramenta para acelerar o processo de maturação.

A caracterização da protease no extrato enzimático bruto sugeriu a presença de uma metaloprotease, o que foi confirmado após a purificação da enzima através de técnicas de precipitação e cromatografia de filtração em gel.

Os parâmetros de pH ótimo e inibição geralmente são usados para classificar as proteases. Metaloproteases geralmente são neutras ou alcalinas. A protease de *Thermoascus aurantiacus* não se encaixou nesse critério, sendo um primeiro relato de metaloprotease com pH ótimo levemente ácido.