

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MULTICENTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

EMMLY ERNESTO DE LIMA

**Produção, Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por
Fungos Filamentosos e Aplicação Biotecnológica**

CAMPO GRANDE, MS
SETEMBRO DE 2016

EMMLY ERNESTO DE LIMA

**Produção e Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por
Aspergillus terreus e sua Aplicação no Processamento do Couro**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni

CAMPO GRANDE, MS

EMMLY ERNESTO DE LIMA

**Produção e Caracterização Bioquímica de Proteases Produzida por
Aspergillus terreus e sua Aplicação no Processamento do Couro**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como um dos requisitos para obtenção do grau de mestre pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

Aprovado dia 09 de setembro de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. (a) Dr. (a) Fabiana Fonseca Zanoelo
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. (a) Dr. (a) Giovana Cristina Giannesi
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Dr. Newton Valério Verbisck
Embrapa Gado de Corte- Banca Externa

AGRADECIMENTOS

À Fundect pelo investimento na pesquisa e o apoio financeiro durante os 24 meses do mestrado.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS pela estrutura acadêmica e pessoal, todos os funcionários, alunos e professores.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Fabiana Fonseca Zanoelo, e a professora Giovana Cristina Giannesi, orientação, pela sabedoria, compreensão e apoio em momentos difíceis que ocorreram durante o mestrado.

Aos laboratórios LeBio e Farmacognosia, em especial a Prof.^a Dr.^a Aline Lorenz-Lemke.

Ao Dr. Newton Valério Verbisck na importante ajuda na elaboração dos géis e conselhos relevantes para o desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma me auxiliaram durante os experimentos ou até mesmo me apoiaram emocionalmente. Em especial a Patrícia Oliveira da Silva, Daniel Guerra, Regiane Spalanzanni, Evelyn de Andrade Salomão, John Dayvan Maidana Serpa.

À Clarice Rossato Marchetti, responsável pela manutenção da micoteca, na qual trabalha com muita dedicação.

Às técnicas Michelle Sorgato e Ângela Akimi Shimakuro.

Aos meus pais, Samuel de Lima e Vania Regina Ernesto de Lima.

ÍNDICE

Lista de figuras	
Lista de tabelas	
Lista de abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Proteases	1
1.2 Fungos filamentosos	2
1.3 Condições para produção enzimática	3
1.4 Aplicação econômica das proteases	5
1.4.1 Proteases aplicadas na indústria de detergentes	5
1.4.2 Proteases aplicadas na indústria alimentícia	5
1.4.3 Proteases aplicadas em ração animal	6
1.4.4 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica	6
1.4.5 Proteases no curtimento do couro	6
1.4.5.1 Processo de fabricação do couro e possível aplicação da protease	7
2 OBJETIVO GERAL	9
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Isolamento, identificação e manutenção dos microrganismos	10
3.2 Cultura monospórica e obtenção dos conídios	10
3.3 Fluxograma de atividades desenvolvidas	11
3.4 Meio de cultura e inóculo	11
3.5 Otimização do meio de cultura	12
3.6 Determinação da atividade proteolítica	13
3.7 Quantificação de proteínas	13
3.8 Purificação de protease extracelular	13
3.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)	14
3.10 Caracterização Bioquímica das Proteases Semi-purificadas	14
3.10.1 Influência da temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática	14
3.10.2 Influência do pH e estabilidade da enzima ao pH	15
3.10.3 Efeito de íons na atividade enzimática	15
3.10.4. Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática	15
3.10.5. Efeito de surfactantes na atividade enzimática	15

3.10.6. Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática	16
3.11. Atividade depilatória e avaliação visual do couro tratado	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
4.1 Otimização dos processos fermentativos para a produção de protease extracelular....	17
4.2. Purificação das proteases extracelular	26
4.3. Caracterização Bioquímica das proteases semi-purificadas	29
4.3.1 Influência da temperatura e estabilidade térmica nas atividades enzimáticas.....	30
4.3.2 Influência do pH e estabilidade ao pH nas atividades enzimáticas.....	34
4.3.3 Efeito de íons metálicos e EDTA nas atividades enzimáticas	38
4.3.4 Efeito de solventes orgânicos nas atividades enzimáticas	40
4.3.5 Efeito de surfactantes nas atividades enzimáticas.....	41
4.3.6 Efeito de inibidores nas atividades enzimáticas.....	43
4.4 Atividade depilatória e avaliação visual do couro tratado	44
5. CONCLUSÃO	45
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
Anexo.....	55

RESUMO

A indústria do couro é considerada como uma das mais poluentes por utilizar produtos tóxicos, além de gerar grandes quantidades de resíduos durante as etapas de curtimento. Uma alternativa para a redução dos danos ambientais é a substituição de produtos tóxicos por proteases na etapa de depilação. O objetivo desse estudo foi analisar e comparar a produção, purificação e características bioquímicas de proteases produzidas pelos fungos filamentosos *Aspergillus terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}. As fontes indutoras foram 1% de farelo de trigo para *A. terreus*₃₁ e 0.5 % farelo de trigo + 0.5 % de pena de galinha para *A. terreus*_{CM6}. O pH inicial ótimo foi de 6.0 e 6.5 para *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}, respectivamente, e a máxima produção ocorreu após 72 horas de fermentação sob agitação constante (110 rpm). O método de purificação foi eficiente para a protease de *A. terreus*₃₁, necessitando da aplicação de outros métodos cromatográficos para a purificação de *A. terreus*_{CM6}. As proteases extracelulares apesar de serem produzidas por fungos da mesma espécie mostraram diferenças nas características bioquímicas. Devido a inibição por PMSF, as proteases foram classificadas como serino protease, e apresentaram pH 6.5 como ótimo para atividade enzimática. A estabilidade ocorreu em pH 6.5 - 7.0 para *A. terreus*₃₁, e pH 5.5 – 6.5 para *A. terreus*_{CM6}, havendo ativação da atividade proteolítica com a adição de FeSO₄. As enzimas tiveram atividade ótima em temperaturas de 50 °C (*A. terreus*₃₁) e 55 °C (*A. terreus*_{CM6}), e foram resistentes a diversos solventes orgânicos (metanol, isopropanol, acetona, butanol, acetonitrila e DMSO) e surfactantes (tween 60, PEG, triton X 100 e CTAB). Ambas as proteases tiveram sucesso na depilação do couro cru utilizando extrato bruto com 300 U de enzima, após 48 horas de incubação. Os fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} foram capazes de produzir proteases com característica bioquímica importantes para o emprego industrial, e a capacidade depilatória sem assistência química. Os resultados mostram que as proteases produzidas pelos fungos apresentam baixo custo de produção e na depilação, além de características bioquímicas importantes para a aplicação industrial.

Palavras-chave: *Aspergillus terreus*, peptidases, resíduos agroindustriais, atividade depilatória do couro.

ABSTRACT

The leather industry is considered one of the most polluting by using toxic products, in addition to generating large amounts of waste during the tanning steps. An alternative for reducing environmental damage is the replacement of toxic products by proteases in the depilation stage. The objective of this study was to analyze and compare the production, purification and biochemical characteristics of proteases produced by the filamentous fungi *Aspergillus terreus*₃₁ and *A. terreus*_{CM6}. The inducing sources were 1% wheat bran for *A. terreus*₃₁ and 0.5% wheat bran + 0.5% feather of chicken for *A. terreus*_{CM6}. The initial optimum pH was 6.0 and 6.5 for *A. terreus*₃₁ and *A. terreus*_{CM6}, respectively, and maximum production occurred after 72 hours of fermentation under constant stirring (110 rpm). The purification method was efficient for the *A. terreus*₃₁ protease, necessitating the application of other chromatographic methods for the purification of *A. terreus*_{CM6}. Extracellular proteases, although produced by fungi of the same species, showed differences in biochemical characteristics. Due to inhibition by PMSF, the proteases were classified as serine protease, and presented pH 6.5 as optimum for enzymatic activity. Stability occurred at pH 6.5 - 7.0 for *A. terreus*₃₁, and pH 5.5 - 6.5 for *A. terreus*_{CM6}, with activation of proteolytic activity with addition of FeSO₄. The enzymes had optimum activity at temperatures of 50 ° C (*A. terreus*₃₁) and 55 ° C (*A. terreus*_{CM6}), and were resistant to various organic solvents (methanol, isopropanol, acetone, butanol, acetonitrile and DMSO) and surfactants (tween 60, PEG, triton X 100 and CTAB). Both proteases were successful in depilation of raw hide using crude extract with 300 U of enzyme after 48 hours of incubation. The fungi *A. terreus*₃₁ and *A. terreus*_{CM6} were able to produce proteases with biochemical characteristics important for the industrial use, and the depilatory capacity without chemical assistance. The results show that the proteases produced by the fungi present low cost of production and epilation, besides biochemical characteristics important for the industrial application.

Keywords: *Aspergillus terreus* peptidase, agro-industrial waste, depilatory activity leather.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma das etapas de fermentação, purificação e caracterização bioquímica da proteases produzidas por <i>Aspergillus terreus</i> ₃₁ e <i>Aspergillus terreus</i> CM6.....	11
Figura 2 - Influência das fontes de carbono na produção de protease extracelular.....	20
Figura 3 - Influência do pH inicial do meio na produção de protease extracelular.....	23
Figura 4 - Influência do tempo e condição de crescimento na produção de protease extracelular.....	25
Figura 5 - Análise de protease extracelular de <i>A. terreus</i> ₃₁ em gel SDS-PAGE.....	28
Figura 6 - Análise de protease extracelular de <i>A. terreus</i> CM6 em gel SDS-PAGE.....	29
Figura 7 - Influência da temperatura sobre a atividade enzimática de protease extracelular.....	31
Figura 8 - Estabilidade térmica sobre a atividade enzimática de protease extracelular.....	33
Figura 9 - Influência do pH sobre a atividade enzimática de protease extracelular.....	35
Figura 10 - Influência da estabilidade ao pH sobre a atividade enzimática de protease extracelular.....	37

Figura 11	-	Atividade depilatória de couro bovino cru.....	45
------------------	---	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Influência de fontes de nitrogênio na produção de protease extracelular.....	24
Tabela 2 - Purificação protease extracelular de <i>Aspergillus terreus</i> 31.....	27
Tabela 3 - Purificação protease extracelular de <i>Aspergillus terreus</i> CM6.....	27
Tabela 4 - Efeito de íons na atividade da protease extracelular purificada.....	39
Tabela 5 - Efeito de solventes orgânicos na atividade de protease extracelular purificada.....	41
Tabela 6 - Efeito de surfactantes na atividade da protease extracelular purificada.....	42
Tabela 7 - Efeito de inibidores de protease na atividade da protease extracelular purificada.....	43

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E UNIDADES

%	porcento
µg	micrograma
µL	microlitro
µmol	micromol
BDA	ágar dextrose batata
BOD	demanda bioquímica de oxigênio
BSA	albumina sérica bovina
CAPS	ácido 3-[cyclohexilamino]-1-propano sulfônico
cm	centímetro
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DEAE celulose	dietilaminoetil- celulose
DMSO	sulfóxido de dimetilo
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
g	grama
h	hora
kDa	quilodalton
M	molar
mA	miliampère
min	minuto
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
nm	nanômetro
°C	grau Celsius
PEG	polietileno glicol
pH	potencial de hidrogênio iônico
pI	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonila
rpm	rotação por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida

TCA	ácido tricloro acético
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletildiammina
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Tyr	tirosina
Tween 60	polisorbitano 60
U	unidade
V	volts

1. INTRODUÇÃO

1.1 Proteases

As proteases ou peptidases são enzimas que se caracterizam por hidrolisar ligações peptídicas (CO-NH), degradando proteínas, resultando em peptídeos ou aminoácidos livres. São classificadas como hidrolases peptídicas e constituem uma grande família de enzimas. Podem ser divididas em dois grupos principais, as endo e exopeptidases. As exopeptidases agem clivando as ligações peptídicas próximas às regiões de amino ou carboxi-terminal e são denominadas como amino ou carboxipeptidases. Já as endopeptidases são caracterizadas pela sua hidrólise preferencial por ligações peptídicas nas regiões interiores da proteína (Rao *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2015).

A família das proteases é classificada também de acordo com o intervalo de pH no qual tem atividade mais elevada. São chamadas de ácidas as proteases com maior atividade variando de pH 2.0 a 6.0, proteases neutras variando de pH 6.0 a 8.0, e proteases alcalinas apresentam alta atividade variando de pH 8.0 a 13.0 (Rao *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2015).

Podem também ser classificadas de acordo com o mecanismo de catálise, como: serino protease, aspártico protease, cisteíno protease, metaloprotease. As serino proteases possuem em seu sítio ativo o grupo serina. São geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com atividade ótima do pH 7.0 a 11.0. Dentro do grupo das serino protease destacam-se enzimas como quimiotripsina, tripsina e elastase. Aspártico protease, são geralmente proteases ácidas, endopeptidases, e apresentam resíduos de ácido aspártico no seu sítio ativo. As cisteíno protease possuem em seu sítio catalítico os três aminoácidos: cisteína, histidina e asparagina. A enzima mais conhecida desse grupo é a papaína. Já as metaloproteases apresentam maior diversidade e são caracterizadas pela necessidade de íons metálicos bivalentes para exercem atividade catalítica (Souza *et al.*, 2015; Mandujano-González *et al.*, 2016; Verma *et al.*, 2016)

Peptidases podem ser produzidas por plantas, animais e microrganismos, e estão envolvidas em vários aspectos fisiológicos e no desenvolvimento dos seres vivos. Podemos citar sua participação na degradação de proteínas defeituosas, iniciação da morte celular, modificação pós-traducional de proteínas, processo inflamatório e coagulação do sangue (Souza *et al.*, 2015).

Das proteases produzidas por plantas, as mais conhecidas são a papaína e a bromelina. A papaína é extraída do látex de *Carica papaya*, e a bromelina é extraída da haste e do suco de abacaxi. Ambas há muito tempo têm sido utilizadas comercialmente no amaciamento de carne. Dentre as proteases de origem animal podemos destacar a tripsina e a pepsina, que são enzimas digestivas responsáveis pela digestão de proteínas no intestino e estômago. Os microrganismos produzem uma variedade de proteases de forma intracelular e extracelular, e diferentes dos animais e plantas, produzem enzimas em ampla escala (Veloortalappil *et al.*, 2013).

De forma geral, as proteases intracelulares exercem o importante papel em processos metabólicos e celulares, tais como maturação de enzimas e hormônios e a manutenção do banco de proteínas. A função de proteases extracelulares é hidrolisar proteínas grandes em menores para absorção. Em fungos especificamente, as proteases exercem o importante papel de formação e germinação dos esporos (Rao *et al.*, 1998; Mandujano-González *et al.*, 2016).

1.2 Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos possuem células unidas pela extremidade formando o filamento ou hifa, que é a unidade básica vegetativa. São organismos heterotróficos, ou seja, realizam digestão externa na obtenção da fonte energética. Colonizam de forma abrangente o ambiente e são caracterizados de acordo com seu modo de vida. Quando se nutrem de matéria orgânica morta recebem o nome de fungos saprofíticos (Yike, 2011). Quando habitando tecidos saudáveis das plantas acima do solo sem provocar sinal de infecção visível são chamados de fungos endofíticos. As hifas dos fungos endofíticos ficam alojadas nos espaços intra e intercelulares das partes aéreas das plantas como nas bainhas de folhas e dentro das cascas. Sua capacidade de penetrar e colonizar as plantas hospedeiras está relacionado com a produção de enzimas como amilases, lipases e proteases (Corrêa *et al.*, 2014).

Devido a sua característica heterotrófica os fungos filamentosos possuem a capacidade de produzir extracelularmente diferentes tipos de enzimas. Ganham destaque como microrganismos de uso industrial por serem capazes de crescer em substratos de baixo custo e de fácil remoção celular quando comparado com bactérias. Das enzimas produzidas por fungos podemos destacar glucoamilase, celulase, hemicelulase, lipase, lacase, catalase e protease. Entretanto, da diversidade de fungos filamentosos encontrados

na natureza, poucas espécies são exploradas comercialmente como fonte produtora de enzima. O gênero *Aspergillus* domina o mercado mundial com representantes das espécies *A. niger* e *A. oryzae* (Zaferanloo *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015; Kovačec *et al.*, 2016; Mandujano-González *et al.*, 2016).

O gênero *Aspergillus* pertence ao Filo Ascomycota, Ordem Eurotiales e Família Trichocomaceae. Esse gênero representa o grupo de fungos filamentosos com maior diversidade dentro dos ascomicetos. Podem habitar solo, matéria orgânica em decomposição, e algumas espécies são parasitas de plantas, animais e seres humanos. Suas colônias geralmente possuem coloração verde, marrom, amarelo, bege, branca ou combinação destas cores. As espécies mais conhecidas são *A. niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus* e *A. terreus* (Pereira *et al.*, 2008; Budak *et al.*, 2014).

Fungos do gênero *Aspergillus* possuem muitos representantes saprofíticos, e são conhecidos por serem microrganismos de diversidade catabólica e anabólica, característica aplicada na indústria. Exemplo da utilidade do gênero é a espécie *A. oryzae* que é usada na fermentação da soja e do arroz para posterior utilização nos produtos tradicionais asiáticos, como saquê e molho de soja (Ropars *et al.*, 2012).

O gênero *Aspergillus* se destaca como produtor de protease, mas podemos citar também outros gêneros como *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces* (Souza *et al.*, 2015). Dentro de *Aspergillus* as espécies *A. candidus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. melleus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. sojae* e *A. sydowi* são encontrados na literatura como maiores produtoras de protease (Veloortalappil *et al.*, 2013).

1.3 Condições para produção enzimática

O crescimento contínuo do mercado de enzimas industriais é dependente da identificação e caracterização de novas enzimas a partir de fontes naturais e, da modificação destas enzimas para melhorar o desempenho e o alto nível de expressão enzimática. Mesmo que a enzima seja conhecida e comercializada de diversas maneiras, ainda é necessário o desenvolvimento de melhores técnicas de produção e novas aplicações em áreas inexploradas. A produção de protease ocorre em um tempo relativamente curto e está sendo melhorada significativamente pela utilização de fungos, bactérias e microrganismos geneticamente modificados. (Souza *et al.*, 2015).

A produção de enzimas em larga escala geralmente ocorre sob fermentação submersa, onde os fungos são crescidos num sistema líquido. Deste modo, pode-se controlar fatores como pH, temperatura e aeração, além de recuperar facilmente a enzima produzida extracelularmente (Mandujano-González *et al.*, 2016).

Independentemente do método de cultivo ou o organismo a ser utilizado, existe a necessidade do estudo para otimização da produção de enzimas. Cada organismo possui sua condição especial para expressão enzimática, e a otimização da composição do meio de cultura contribui para diminuir os custos e aumentar a produção das enzimas de interesse industrial (Corrêa *et al.*, 2014).

A produção enzimática além de eficiente precisa ter baixo custo para ser aplicada industrialmente. Uma maneira de reduzir os custos de produção é a utilização de resíduos agroindustriais. Os resíduos agroindustriais são de grande variedade e tipos, e muitas vezes são considerados um problema ao serem descartados pelas indústrias. A fonte de carbono para o processo de produção enzimática pode ser fornecida direta ou indiretamente por esses resíduos. Com a crescente preocupação no uso e gerenciamento de recursos e resíduos, não somente pelas organizações não governamentais (ONGs), mas também pelas grandes e pequenas empresas, pode-se desenvolver melhor relação entre custo-eficácia usando resíduos agroindustriais baratos disponíveis como resíduos de erva-mate, bagaço de cana, farelo de arroz e farelo de trigo (Mukhtar e Haq, 2013; Harangozó e Zilahy, 2015). Muitos estudos da produção de protease por fungos filamentosos têm obtido sucesso com o uso de resíduos agroindustriais (Souza *et al.*, 2015).

1.4 Aplicação econômica das proteases

Buscando encontrar soluções sustentáveis, as enzimas tem sido utilizadas industrialmente por terem rápida ação, agirem em condições suaves (como de temperatura, pH e condições atmosféricas), por serem específicas e biodegradáveis (Adrio e Demain, 2014). Enzimas como proteases, carboidrases (amilases, celulasas e xilanases), lipases e fitases lideram a produção e comercialização mundial. São aplicadas em três segmentos de mercado: enzimas técnicas (aplicadas em produtos de limpeza, têxtil, couros, álcool como combustível e papel); enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para a ração animal (Souza *et al.*, 2015). Mas a liderança está com as proteases, que representam 60 % do total de enzimas comercializadas em todo o mundo sendo sua maior aplicação na indústria de detergentes, laticínio e couro (Cherry e Fidantsef, 2003; Souza *et al.*, 2015).

1.4.1 Proteases aplicadas na indústria de detergentes

O maior destaque da aplicação de proteases está na fabricação de detergentes, sendo um dos componentes essenciais empregados na remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais, além de compor reagentes de lavagem de lentes de contato e dentaduras. Seu papel é hidrolisar moléculas grandes de proteína associadas a manchas difíceis. Para tal aplicação, é necessário que a protease seja estável em pH alcalino, altas temperaturas e ter sua ação em uma ampla variedade de substratos protéicos. Frequentemente é combinada com outras enzimas como amilase, celulase e lipase (Rao *et al.*, 1998; Khan, 2013; Velloorvalappil *et al.*, 2013).

1.4.2 Proteases aplicadas na indústria alimentícia

Na produção de queijos, as proteases são usadas na coagulação do leite através da hidrólise de ligações peptídicas. Entre as proteases utilizadas neste processo destaca-se a quimosina, sendo a protease preferida devido à alta especificidade pela k-caseína (Rao *et al.*, 1998).

Na panificação, enzimas proteolíticas podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas, como por exemplo, proteases de *Aspergillus oryzae* cuja ação sobre o

glúten da farinha de trigo afeta a elasticidade e a textura, além de contribuir para redução do tempo de mistura da massa e no custo de produção (Souza *et al.*, 2015).

1.4.3 Proteases aplicadas em ração animal

Proteína é o componente principal de rações animais, mas nem todas as proteínas são metabolizadas, liberando no ambiente grandes quantidades de compostos nitrogenados através do estrume. As proteases podem ser adicionadas na fabricação da ração a fim de melhorar a digestibilidade, garantindo uma melhor nutrição além de diminuir a emissão de óxido nitroso e amônia no ambiente (Jegannathan e Nielsen, 2013).

1.4.4 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica

As proteases na indústria farmacêutica e cosmética tem aplicação na eliminação de queratina na acne ou psoríase, eliminação de calos e degradação humana de pele queratinizada e preparação de vacina terapêutica para dermatofitose. Pode também remover e regenerar a cicatriz do epitélio e acelerar o processo de cicatrização (Souza *et al.*, 2015).

1.4.5 Proteases no curtimento do couro

A indústria de curtume é vasta em todo o mundo, e países como Turquia, China, Índia, Paquistão e Brasil ganham destaque na produção mundial (Lofrano *et al.*, 2013). Considerando o comércio global de couro, estima-se que esse setor movimente 70 bilhões de dólares anualmente. Apesar da influência econômica, o curtimento do couro possui uma imagem negativa devido aos impactos ambientais gerados pelo uso de produtos químicos perigosos como cromo, taninos sintéticos, óleos, resinas, detergentes e a eliminação descuidada de resíduos sólidos. Muitos são os processos utilizados na fabricação do couro para que um produto cru perecível se torne durável. Dentre esses processos está a etapa de depilação, onde a depilação convencional do couro é realizado com o uso de sulfato de sódio, resultando em consequências ambientais desfavoráveis. Podemos citar os danos como 84 % da demanda bioquímica de oxigênio (BOD), 92 % de sólidos suspensos, bem como, prejuízos na eficácia de tratamento dos afluentes. Atualmente, tem se aplicado duas estratégias para minimizar o impacto negativo da

atividade de processamento do couro, relacionadas com a substituição de produtos químicos nocivos por produtos menos agressivos, e o tratamento das águas residuais (Dixit *et al.*, 2015).

Proteases alcalinas podem desempenhar um papel vital no tratamento do couro por substituir produtos químicos perigosos envolvidos no processo da fase depilatória e curtimento (Souza *et al.*, 2015). Além da depilação, as proteases podem ser utilizadas na abertura da matriz da fibra do couro e melhorar a difusão de taninos vegetais. Assim, ocorre maior absorção de taninos vegetais, melhoria da qualidade do couro e redução da poluição em virtude da menor quantidade de produto empregado (Kanth *et al.*, 2009; Christopher *et al.*, 2014).

1.4.5.1 Processo de fabricação do couro e possível aplicação da protease

Muitas são as técnicas utilizadas no curtimento do couro, mas de forma geral, pode ser dividido em quatro etapas: cura, fase preparatória, curtimento e descamação/decapagem. O processo geralmente ocorre dentro de tambores que giram em seu próprio eixo para proporcionar contato uniforme dos reagentes com o couro (Morera *et al.*, 2007).

- 1- Cura: a pele crua é conservada com a aplicação de sal para evitar a degradação por microrganismos.
- 2- Fase preparatória: pelos são aparados. Remoção física do excesso de músculo e gordura aderente à pele. Dentro dessa fase ocorre:
 - Imersão: a pele é hidratada para a recuperação da água perdida durante a cura e, possibilitar a abertura das estruturas das fibras;
 - Calagem: é realizada a remoção dos pelos com cal (10 a 20 % de cal) e sulfeto de sódio (2 a 5 %);
 - Desencalagem: por meio de sucessivas lavagens ocorre a remoção do cal e posterior adição de sais de amônio para neutralizar o pH;
 - Depilação: aplicação de hidróxido de cálcio;
 - Desengorduramento: uso de solventes orgânicos e surfactantes para a remoção do excesso de tecido adiposo;
- 3- Curtimento: é a conversão do couro cru ou pele em um material estável, flexível, sem putrefação. No início deste processo tem-se o pH 3.0 e no final o pH é aumentado. O curtimento do couro é feito com a reação entre a pele e o sal

trivalente de cromo. O couro é imergido em bicarbonato de sódio ou ácido sulfúrico para o branqueamento e remoção de taninos da superfície da pele. Após a descoloração, ocorre o curtimento vegetal (duração de até 3 semanas) para a coloração do couro. São adicionados taninos sintéticos, óleos e resinas para tornar o couro mais macio.

- 4- Descamação/ decapagem: Nesta etapa ocorre o desbaste, recurtimento e lubrificação do couro. Há o aumento da acidez para permitir a penetração de taninos e cromo na pele. Nesta fase ocorre novamente a hidratação, depilação, re-cromagem, neutralização do pH, re-curtimento (a pele é tratada com sais de cromo, substâncias vegetais, aldeídos e óleos), tingimento, engorduramento, clareamento, secagem, condicionamento e polimento.

Finalmente, ocorre o acabamento que aumenta a resistência da cor a manchas e arranhões, ocorre o alisamento e esticamento do couro, secagem, condicionamento, polimento e revestimento. O revestimento da superfície inclui a lubrificação, escovação, cobertura, impregnação e polimento.

Dentro da fase preparatória e descamação, uma maneira alternativa a depilação e ao desengorduramento é a aplicação de proteases e lipases. As lipases podem substituir o uso de solventes orgânicos, já que são capazes de degradar triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos. As proteases podem substituir o uso de sulfeto de sódio e o cal durante o processo de depilação (Lofrano *et al.*, 2013; Dixit *et al.*, 2015; Kanagaraj *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO GERAL

Analisar e comparar o padrão de produção, purificação e características bioquímicas de proteases produzidas pelos fungos filamentosos *Aspergillus terreus* ³¹ (endofítico) e *Aspergillus terreus* _{CM6} (saprofítico), visando a aplicação biotecnológica das enzimas no processamento do couro.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Avaliar diferentes parâmetros da fermentação submersa na produção de protease tais como: fonte de carbono, fonte de nitrogênio, pH inicial do meio de cultura, estado fermentativo (estacionário e agitado) e tempo de crescimento;
- ii) Purificar e caracterizar bioquimicamente as proteases extracelulares quanto ao efeito de: temperatura, pH, estabilidade a temperatura e pH, íons, solventes orgânicos, surfactantes e inibidores
- iii) Avaliar a capacidade depilatória do couro cru utilizando proteases extracelulares.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Isolamento, identificação e manutenção dos microrganismos

Para os experimentos foram utilizados duas cepas de fungos da espécie *Aspergillus terreus*. O fungo *Aspergillus terreus* (saprofítico) nomeado como CM6, foi isolado de folhas em decomposição de *Brachiara brizantha* (Hochst) Stap na base experimental da Embrapa Gado de Corte em Campo Grande, MS. O fungo *A. terreus* (endofítico) nomeado como 31, foi isolado de folhas de *Memora peregrina* (Miers) Sandwith (Bignoniaceae), uma espécie nativa do Cerrado de Mato Grosso do Sul. Os fungos foram identificados morfológicamente pela Prof.^a Dr.^a Cristina Maria Mota responsável pela Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco UFPE – URM (PE, Brazil) e depositados na Micoteca da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS). Os repiques fúngicos feitos a partir da colônia monospórica são mantidos em tubos de ensaio contendo meio sólido de Ágar Dextrose Batata (BDA, Oxoid, UK), a 30°C, por 5-7 dias e posteriormente conservados a 4°C, podendo ser utilizadas por até 30 dias após estocagem.

3.2 Cultura monospórica e obtenção dos conídios

Para a obtenção de colônias monospóricas seguiu-se a metodologia de Mello (2011), onde foram realizadas diluições de esporos em solução de NaCl (0,085 %) até a concentração inferior a $9,5 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente, inoculou-se a solução em meio BDA. A partir de uma única colônia formada, foi realizado novo repique em meio BDA. Desse novo repique obteve-se então a colônia mãe mantida em estoque, do qual partiram os repiques subsequentes.

Os conídios obtidos a partir das colônias monospóricas foram colhidos por uma suspensão aquosa, acrescentando-se 25 mL de água destilada estéril em dois tubos de ensaio e raspando-se a superfície da cultura com uma alça de henle. O volume de 2 mL dessa suspensão contendo aproximadamente 10^8 conídios foram utilizados para inóculo no meio líquido.

3.3 Fluxograma de atividades desenvolvidas

A **figura 1** representa o fluxograma das etapas realizadas para produção, purificação e caracterização bioquímica das proteases produzidas neste trabalho.

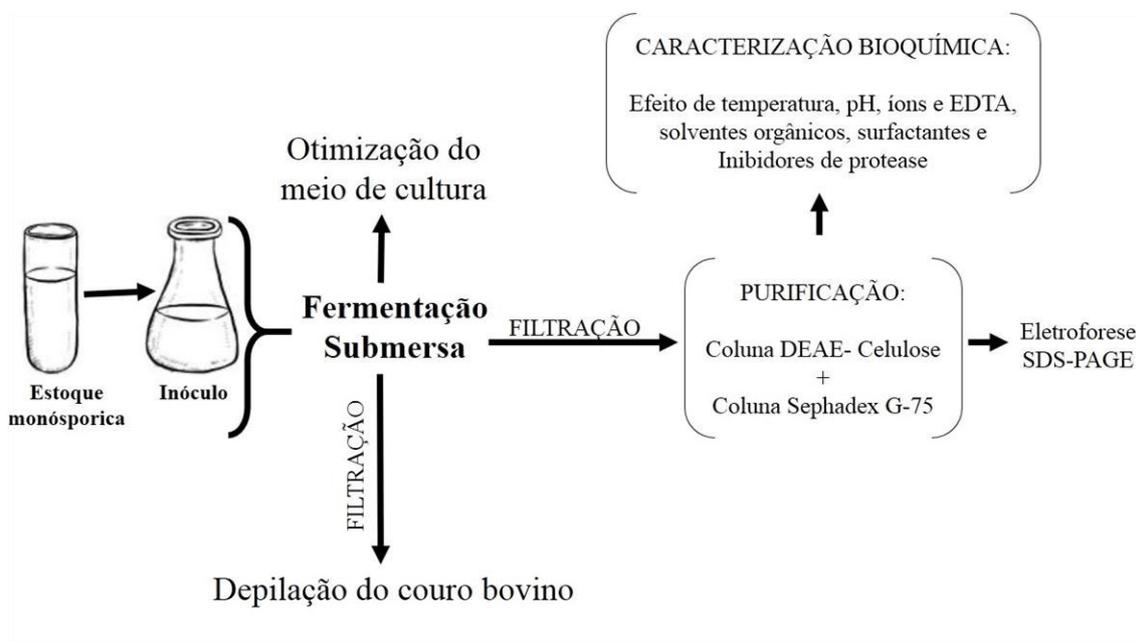


Figura 1. Fluxograma das etapas de fermentação, purificação e caracterização bioquímica das proteases produzidas por *Aspergillus terreus*₃₁ e *Aspergillus terreus*_{CM6}.

3.3 Meio de cultura e inóculo

A produção das proteases pelos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} foi realizada em meio líquido Khanna (Khanna *et al.*, 1995) cuja composição está descrita abaixo:

NH₄NO₃ (2%); KH₂PO₄ (1,3%); MgSO₄. 7 H₂O (0,36 %); KCl (0,0098%); ZnSO₄. H₂O (0,007%); MnSO₄. H₂O (0,013%); Fe₂(SO₄)₃. 6 H₂O (0,0066%); CuSO₄. 5 H₂O (0,0062%), Extrato de Levedura (0,1%), água destilada qs.p 100 mL. Após o preparo o meio foi autoclavado a 120°C por 20 minutos.

Os fungos foram inoculados em suspensão de 25 mL de água utilizando 10⁸ conídios e transferidos para o meio líquido, conforme descrito no item 3.2.

3.4 Otimização do meio de cultura

O primeiro parâmetro avaliado foi à utilização de fonte de carbono alternativa originada de resíduos agroindustriais, como farelo de trigo e pena de galinha. Os fungos foram crescidos em meio líquido Khanna com 1% de farelo de trigo, 1% de farelo de pena de galinha ou a mistura de 0,5% de farelo de trigo + 0,5% de farelo de pena de galinha (Farelo/Pena). A pena de galinha foi previamente lavada, autoclavada e triturada, para assim aumentar a superfície de contato com o micélio fúngico.

Após a padronização da melhor fonte de carbono, foi avaliada a suplementação com fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. Foram adicionados ao meio de cultura 1% de Peptona, Albumina, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ou NaNO_3 . Em seguida, avaliou-se a influência do pH inicial do meio de cultura, no qual os fungos foram crescidos em meio líquido Khanna com pH variando de 4.0 a 8.5 (com acréscimo de 0.5).

Para a os parâmetros fermentativos fonte de carbono, fonte de nitrogênio e pH inicial do meio de cultura, os fungos cresceram em frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio líquido Khanna (Khanna et al., 1995), sob condição agitada (110 rpm), durante 72 horas à 30 °C. Após o crescimento, o material fermentado foi filtrado em papel filtro o sobrenadante utilizado como fonte de enzima extracelular.

Finalmente, para a otimização do tempo de crescimento e estado fermentativo os fungos cresceram em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL do meio líquido Khanna, por um período de 24 a 144 horas sob condição agitada (em mesa agitadora orbital, 110 rpm) e sob condição estática (em estufa), a temperatura de 30 °C. Em intervalos de 24 horas retirou-se alíquotas de 2 mL que foram centrifugadas durante 15 minutos a 8.000 gx, para separação do micélio. O sobrenadante livre de células foi utilizado nas dosagens de ensaio enzimático e quantificação de proteínas.

Os resultados foram expressos em U/mL. Entretanto, os resultados para o influência do pH inicial do meio de cultura foram apresentados em atividade relativa, onde o pH com maior indução na produção enzimática foi considerado como 100%. Para cada parâmetro fermentativo foram realizados três testes independentes, e os valores representaram à média e desvio padrão.

3.5 Determinação da atividade proteolítica

A atividade da protease foi determinada utilizando-se caseína como substrato, conforme a metodologia descrita por SARATH et al (1989). A mistura da reação foi composta por tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM, pH 6.5, contendo caseína 1% como substrato e 100 µL enzima devidamente diluída. A temperatura de incubação inicialmente foi de 35 °C, e foi alterada para 50 °C e 55 °C para as proteases dos fungos *Aspergillus terreus* 31 e *A. terreus* CM6 respectivamente após estabelecer a temperatura ótima da enzima. O tempo da reação foi contabilizado e a atividade proteolítica mensurada em unidade de atividade em função do tempo de reação. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000 xg, e o sobrenadante utilizado para leitura em espectrofotômetro em 280nm. A atividade proteolítica foi expressa em unidade por mL (U/mL), definida como a quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 µmol de Tyr/min nas condições de ensaio. O valor de atividade específica foi obtido calculando a razão entre atividade enzimática (U/mL) e proteínas totais (mg de proteína).

3.7 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada segundo o método de Lowry *et al.* (1951), utilizando-se albumina bovina sérica como padrão. A concentração de proteína foi definida em mg de proteína/mL.

3.6 Purificação das proteases extracelular

Os fungos *Aspergillus terreus* 31 e *A. terreus* CM6 foram cultivados em 1 L e 500 mL de meio líquido Khanna respectivamente, sob as condições ótimas de produção da enzima. Os extratos enzimáticos obtidos foram utilizados para dar prosseguimento aos estudos de purificação e caracterização bioquímica.

O sobrenadante do cultivo, considerado como extrato bruto produzido por cada fungo foi submetido nas mesmas condições de purificação, onde primeiramente foram exaustivamente dialisados contra água e liofilizados. O material liofilizado foi ressuspenso em 6 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7.0 e aplicado em coluna de

troca iônica DEAE-celulose (Dietilaminoetil celulose) (1.5 x 5 cm), pré-equilibrada com o mesmo tampão e eluída com gradiente de 0-1 M de NaCl. Frações de 2 mL foram coletadas por tubo, sendo estas submetidas a leitura de proteína a 280 nm e atividade proteolítica segundo descrito no item 3.5. Os tubos com pico de atividade enzimática foram reunidos, dialisados exaustivamente contra água e liofilizados. A amostra liofilizada foi diluída em 2 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7.0 com acréscimo de 100 mM de NaCl e aplicada em coluna Sephadex G-75 (3.5 x 65.0 cm), equilibrada com o mesmo tampão da amostra. A eluição foi feita coletando-se frações de 2 mL por tubo. Os tubos foram dosados quanto a atividade de protease e proteína, e aqueles que apresentaram maior atividade enzimática foram reunidos, dialisados e liofilizados. A amostra após coluna Sephadex G-75 liofilizado foi resuspendida em 2 mL de água deionizada e utilizada para análise do grau de pureza em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e nos processos de caracterização enzimática.

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condição desnaturante (SDS-PAGE)

As alíquotas com amostras de proteína resultante de cada etapa do processo de purificação, foram analisadas por eletroforese sob condição desnaturante em gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Foram utilizadas géis em placa (9.5 x 8.0 cm) na concentração de 10 % de acrilamida. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (β -mercaptoetanol, azul de bromofenol, SDS, Tris, glicerol e H₂O), aquecidas por 5 minutos a 96 °C e submetidas a eletroforese. Utilizou-se uma corrente de 70 mA/placa e uma voltagem constante de 120 V. Após o procedimento, os géis foram retirados da placa e a revelação de proteínas foi feita com Coomassie Brillhante Blue R-250 (Sigma) ou Coomassie Brilliant Blue G (Sigma- Aldrich).

3.10 Caracterização Bioquímica das Proteases Semi-purificadas

3.10.1 Influência da temperatura e termoestabilidade na atividade enzimática

A influência da temperatura na atividade das proteases foi investigada em temperaturas de 30 a 70°C, com variação de 5°C. A estabilidade térmica foi determinada incubando as enzimas diluídas em água nas temperaturas de 45 a 50°C (com variação de

5 °C), em tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos. Posteriormente, a atividade residual das enzimas foi dosada conforme descrito no item 3.5.

3.10.2 Influência do pH e estabilidade da enzima ao pH

A determinação do pH ótimo para a atividade proteolítica foi realizada na temperatura ótima da atividade enzimática, com a variação de diferentes valores de pH utilizando-se os tampões McIlvaine (pH 3.5 ao 8.0; incremento de 0.5) e Ácido 3-[cyclohexilamino]-1-propano sulfônico (CAPS) (pH 9.5, 10.0, 11.0, 11.5, concentração de 100 mM).

A estabilidade ao pH foi estudada com incubação da enzima por 1 hora a 4 °C em pH variando de 5.5 a 7.5, seguido da dosagem residual da atividade enzimática segundo a metodologia estabelecida.

3.10.3 Efeito de íons na atividade enzimática

A influência de íons na atividade de protease foi investigada nas condições de ensaio (descrito no item 3.5) na concentração final de 5 mM.

3.10.4. Efeito de solventes orgânicos na atividade enzimática

Para efeito de solventes orgânicos a enzima foi incubada em concentração de 1:1 com os solventes: Metanol, Isopropanol, Acetona, Butanol, Sulfóxido de Dimetilo (DMSO) previamente diluídos em concentração de 20 %. A incubação foi realizada em temperatura ambiente, durante 10 minutos. Posteriormente, os ensaios foram realizados em condições ótimas de pH e temperatura.

3.10.5. Efeito de surfactantes na atividade enzimática

O efeito de surfactantes na atividade proteolítica foi analisado com a presença de Tween 60, Polietileno glicol (PEG), Triton X 100, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), 1,4 Diotritol (DTT) e Bromido Centrimônio (CTAB). Todos os surfactantes foram previamente

diluídos a 20 %. A enzima foi incubada com concentração de 1:1 dos surfactantes durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, os ensaios foram realizados em condições ótimas de pH e temperatura.

3.10.6. Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática

O efeito de inibidores na atividade enzimática foi avaliado utilizando-se os seguintes compostos: Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF), Etilenodiaminotetraacetato Dissódico (EDTA), Pepstatina e β -Mercaptoetanol. A enzima foi incubada durante 10 minutos em temperatura ambiente com os inibidores em concentração de 10 mM. Posteriormente, os ensaios foram realizados em condições ótimas de pH e temperatura.

3.11. Atividade depilatória e avaliação visual do couro tratado

Pedaços de couro bovino foram utilizados para o experimento de depilação. Primeiramente, as amostras passaram por um processo de descarte seguido por processo de desengorduramento. Para o experimento de depilação, as peles foram lavadas em água corrente e cortadas em pedaços de aproximadamente 5 cm².

A atividade depilatória foi avaliada de acordo com a metodologia adaptada de Rai e Mukherjee (2010) e Pandeeti *et al.* (2011). Os pedaços de couro cru bovino foram submergidos em 10 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6.5 com 100 ou 300 unidades de cada protease bruta produzida pelos fungos *Aspergillus terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}. O couro foi incubado a 30°C, em tempos de 24 e 48 horas, sob agitação constante (50 rpm). Foi considerado como controle o pedaço de couro sem a adição de unidade de enzima. Para a avaliação da atividade depilatória, após o tempo de incubação, os pelos foram gentilmente puxados com o auxílio de uma pinça.

As peles foram analisadas quanto a dois aspectos principais, comparadas ao controle:

1. Presença ou ausência de áreas depiladas;
2. Desprendimento ou não de pelos quando submetidos à ação mecânica com uma pinça.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Otimização dos processos fermentativos para a produção de protease extracelular.

A expressão de inúmeras enzimas produzidas por fungos é regulada em resposta aos sinais do ambiente (Yike, 2011). Para a produção enzimática, principalmente a produção de protease pelos fungos do gênero *Aspergillus*, devemos levar em consideração fatores como fonte de nitrogênio e carbono, aeração, pH e tempo de crescimento. (Fleißner e Dersch, 2010; Souza *et al.*, 2015). Mesmo que os fungos sejam semelhantes, alterações do rendimento da produção de protease podem ser causadas por diferença genética (Oyeleke *et al.*, 2010). Sendo assim, avaliar esses fatores pode garantir uma maior produtividade enzimática e diminuir tempo e os custos de produção de protease.

Iniciamos a otimização do meio de cultura avaliando a influência da fonte de carbono na produção de protease extracelular, condição capaz de aumentar significativamente os níveis de enzima produzida (Hernández-Domínguez *et al.*, 2014). Foram avaliados como fonte de carbono os resíduos de origem agroindustrial, a fim de reduzir os custos de produção além de ser uma alternativa no aproveitamento desses resíduos. Portanto, os fungos foram crescidos com 1% de farelo de trigo, 1 % de pena de galinha ou a mistura 0.5 % de farelo de trigo + 0.5 % de pena de galinha. Na figura 2 podemos observar que o perfil de produção enzimática entre os dois fungos foi semelhante. A melhor produção de protease ocorreu com 1 % de farelo de trigo (11.48 U/mL) para o fungo *Aspergillus terreus* ₃₁ (Figura 2A), seguido da mistura de pena de galinha + farelo de trigo (10.11 U/mL). Já para o fungo *A. terreus* _{CM6} (Figura 2B) a maior produção enzimática foi com mistura de 0.5 % de farelo de pena de galinha + 0.5 % de farelo de trigo (9.88 U/mL), seguido de farelo de trigo (9.50 U/mL).

A agroindústria produz resíduos muitas vezes descartados que podem conter fontes importantes de nutrientes. Com o aproveitamento de resíduos agroindustriais em processo biotecnológicos são geradas quantidades insignificantes de poluentes, e a utilização de microrganismos no manejo de resíduos consome menos energia que o aterro sanitário e a incineração. Devido a versatilidade dos microrganismos, diferentes tipos de produtos podem ser obtidos dependendo do método utilizado e a natureza dos resíduos a serem processados. Resíduos produzidos pela agroindústria podem ser fontes alternativas para o crescimento microbiano, para a produção de biomassa ou de enzimas de interesse

biotecnológico como proteases, que foram produzidas em farelo de trigo e pena de galinha (Haruta *et al.*, 2005; Vandamme, 2009).

Devido aos valores de atividade de protease serem próximos quando comparado com farelo de trigo e a mistura de farelo de trigo e pena de galinha, atribui-se que o farelo de trigo seja o responsável pela maior indução na produção enzimática.

Dentre os resíduos agroindustriais, o farelo de trigo é produzido em todo o mundo em grandes quantidades como um importante subproduto da indústria de cereais, e se destaca como a fonte de carbono indutora na produção de protease e outras enzimas (Souza *et al.*, 2015). Das enzimas produzidas utilizando farelo de trigo como indutor, podemos citar a β -1,4-glucosidase produzidas por *Aspergillus niger* NRRL (Abdella *et al.*), xilanase e celulase por *A. fumigatus* ABK9 (Das *et al.*, 2013), lacase e xilanase por *A. niveus* RP05 (Nogueira *et al.*, 2015), amilase por *Aspergillus* 6V4 (Celestino *et al.*, 2014) e protease por *A. oryzae* (Oyeleke *et al.*, 2010). Além disso, o farelo de trigo pode ser frequentemente usado como substrato para diversos processos biotecnológicos como na produção de massa alimentícia funcional (Pasqualone *et al.*, 2016), produção de bioetanol (Cripwell *et al.*, 2015) e na produção de xilooligossacarídeos industriais (Wang e Lu, 2013).

O farelo de trigo possui aproximadamente 18 % de proteína e 62 % de carboidratos. Tem tamanho de partícula que pode variar de 1.5 a 3 mm, o que garante uma maior superfície de contato e permite maior distribuição de nutrientes (Zanphorlin *et al.*, 2010). Tais características podem ter sido essenciais para a indução das proteases extracelulares pelos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}.

Visando a produção de protease extracelular para a depilação do couro, utilizamos penas de galinhas como fonte de carbono para induzir a produção de queratinases. Apesar das penas das aves serem compostas essencialmente por 90 % de queratina, e pobre em nutrientes, foi capaz de induzir a produção de protease extracelular pelos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}. Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Rodrigues Marcondes *et al.* (2008), onde diversos fungos inclusive do gênero *Aspergillus*, cresceram usando apenas pena de galinha como fonte de carbono e nitrogênio.

Queratinas são proteínas fibrosas, insolúveis em água, resistentes a ácidos fracos, alcalinos e solventes orgânicos. Devido a numerosas ligações dissulfeto em sua estrutura e o arranjo em folha β , as penas são difíceis de serem hidrolisadas por proteases comuns

como tripsina ou pepsina. No entanto, muitos organismos são capazes de produzir queratinases e utilizar a queratina como fonte de carbono e nitrogênio (Gibson *et al.*, 2013).

Todo resíduo de queratina provenientes das penas disponível da indústria de processamento de aves, pode ter um destino ambientalmente amigável. Exemplos dessa aplicação está como fonte de aminoácido na nutrição animal ou como fonte indutora de produção de proteases (Bertsch e Coello, 2005; Rodrigues Marcondes *et al.*, 2008). A produção de protease extracelular pelos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} utilizando pena de galinha como fonte de carbono pode contribuir para o melhor aproveitamento desses subprodutos da agroindústria.

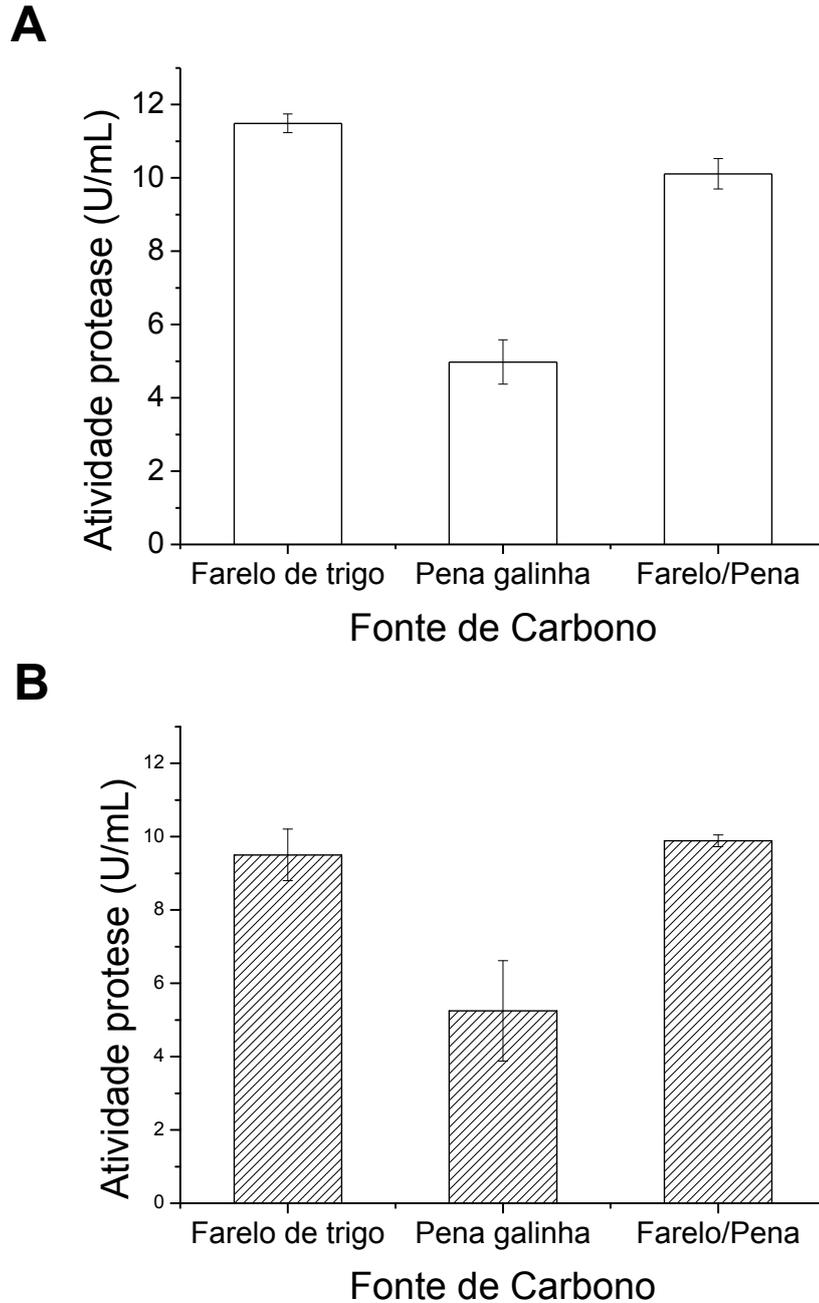


Figura 2. Influência da fonte de carbono na produção de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* ₃₁ **(B)** *Aspergillus terreus* _{CM6}. Condições: Os fungos cresceram em meio líquido Khanna, a 30°C, durante 72 sob condição agitada (110 rpm) com 1% de farelo de trigo; 1% de pena de galinha; ou 0.5% de farelo de trigo + 0.5% de pena de galinha (Farelo/Pena).

A fonte de nitrogênio afeta o crescimento celular e a formação do produto em microrganismos. Sua origem e concentração podem induzir ou reprimir a produção enzimática (Wang *et al.*, 2005). Embora as fontes de nitrogênio complexas sejam normalmente utilizadas para a produção de protease, as exigências da suplementação são específicas de acordo com cada organismo (Souza *et al.*, 2015). Sendo assim, para o teste de influência de fontes de nitrogênio, os fungos foram crescidos com a adição de 1 % de fontes orgânicas e inorgânicas.

Os resultados da tabela 1 mostram que a adição de fonte de nitrogênio ao meio de cultura reduziu a produção de protease extracelular para ambos os fungos testados. A fonte de nitrogênio (NH₄)₂SO₄ reduziu em 27.59 % a produção de protease extracelular para os fungos *A. terreus*₃₁, e 46.43 %, para o fungo *A. terreus*_{CM6}. As fontes orgânicas de nitrogênio, peptona e albumina inibiram em maior porcentagem a produção para *A. terreus*_{CM6} (89.1 %), e *A. terreus*₃₁ (90.7 %) respectivamente.

Níveis elevados de produtos finais, tais como aminoácidos, amônia e fontes metabolizáveis de carbono podem reprimir a produção de protease (Souza *et al.*, 2015). Os resultados sugerem que as fontes de nitrogênio presente no meio de cultura e na fonte de carbono são adequadas para a produção de protease extracelular, e a suplementação tenha causado repressão metabólica. Com as fontes de carbono, e as soluções de sais presentes no meio Khanna em concentrações apropriada sem a necessidade de suplementação, podemos garantir produção de protease pelos fungos *A. terreus*_{CM6} e *A. terreus*₃₁ sem o aumento do custo durante o processo.

Tabela 1. Influência de fontes de nitrogênio na produção de protease extracelular.

	<i>Aspergillus terreus</i> ₃₁	<i>Aspergillus terreus</i> _{CM6}
	Atividade Relativa (%)	Atividade Relativa (%)
Controle	100 (± 0.21)	100 (± 0.04)
Peptona	18.94 (± 1.11)	10.90 (± 0.37)
Albumina	9.30 (± 0.17)	24.59 (± 0.18)
(NH ₄) ₂ SO ₄	72.41 (± 1.20)	53.57 (± 0.33)
NaNO ₃	58.51 (± 0.81)	38,97 (± 0.18)

Condições: os fungos cresceram em meio líquido Khanna, a 30°C, durante 72 sob condição agitada (110 rpm) com 1 % de fonte de nitrogênio e 1 % da melhor fonte de carbono para cada fungo. Controle: sem a suplementação de fonte de nitrogênio.

O pH inicial do meio de cultura é capaz de afetar a função da membrana celular, morfologia da célula, solubilidade de sais, absorção de nutrientes e a biossíntese de produtos, e conseqüentemente a produção de protease. Mesmo dentro da espécie ou até mesmo de isolados fúngicos é possível encontrar diferenças de crescimento em diferentes pHs (Hung e Trappe, 1983; Fang e Zhong, 2002). Com o intuito de avaliar a influência do pH inicial, os fungos foram crescidos em meio líquido Khanna com pH variando de 4.0 a 8.5 (com acréscimo de 0.5).

Na figura 3 (A e B), podemos observar que os fungos são capazes de produzir protease extracelular em uma faixa extensa de pH. Para o fungo *A. terreus*₃₁ há tendência de produção de protease em pHs mais ácidos do que o fungo *A. terreus*_{CM6}. Na figura 3A foram observados três picos de produção enzimática para *A. terreus*₃₁, com máxima produção em pH 6.0, pH 7.5, obtendo o terceiro pico em pH 4.5. Já na figura 3B observamos que para o fungo *A. terreus*_{CM6} a produção de protease ocorreu na faixa de pH 5.5 a 6.5, com maior produção em 6.5, seguido de 6.0 e 5.5.

Altas produções enzimáticas em diferentes pHs sugerem que os fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} apresentam plasticidade fenotípica e conseqüentemente diversidade molecular, podendo ser evidência para a capacidade de produção de diferentes tipos de proteases e de outras enzimas. Na literatura podemos encontrar exemplo semelhante, onde o fungo *Alternaria alternata* mostrou alta produção de protease numa faixa de pH 3.0 ao 9.0, indicando que diferentes condições são adequadas para a produção de protease (Zaferanloo *et al.*, 2014). Os resultados também sugerem a habilidade em produzir diferentes tipos de proteases, já que a produção de enzima é regulada pelo pH do ambiente, e o tipo de protease é relacionada ao pH do meio de cultura (Maccheroni Jr *et al.*, 2004).

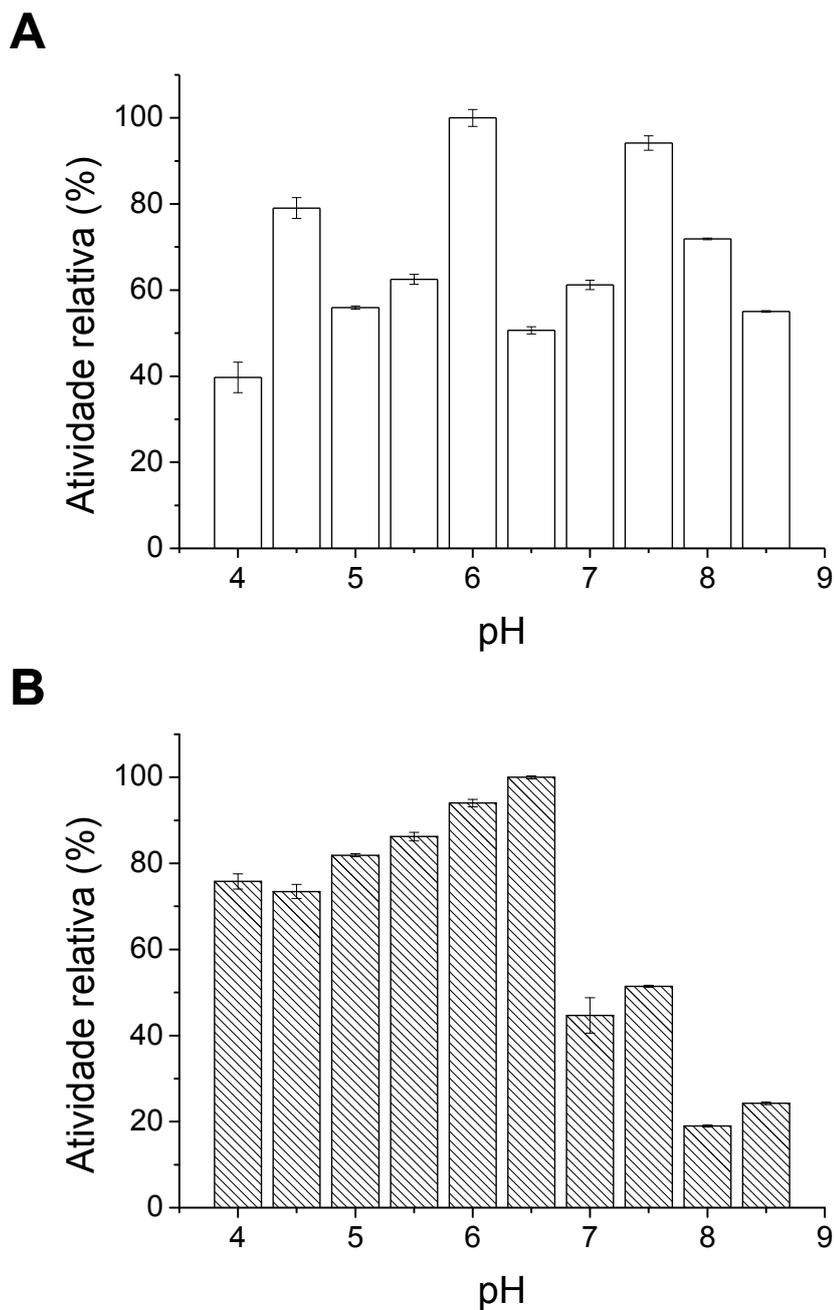


Figura 3. Influência do pH inicial do meio na produção de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* ₃₁ **(B)** *Aspergillus terreus* _{CM6}. Condições: os fungos cresceram em meio líquido Khanna; variando o pH de 4.0 a 8.5 (com incremento de 0.5); 1% da melhor fonte de carbono para cada fungo, a 30°C, durante de 72 horas, sob condição agitada (110 rpm).

Para a otimização do tempo de crescimento e estado fermentativo, os fungos cresceram por um período de 24 a 144 horas sob condição agitada (em mesa agitadora orbital, 110 rpm) e sob condição estática (em estufa). Na figura 4 (A e B), podemos observar que a influência do tempo e a condição do crescimento para a produção de protease foi semelhante para ambos os fungos. O pico de atividade enzimática foi observado em 72 horas de crescimento sob condição agitada para *A. terreus*₃₁ (Figura 4A) e *A. terreus*_{CM6} (Figura 4B), com valores de 20.63 e 19.41 U/mL respectivamente, e após esse período houve um declínio na produção enzimática. Podemos destacar que sob condição agitada a produção de protease extracelular é superior em comparação com a condição estática. A maior produção sob condição agitada pode ser atribuída a transferência de calor e a dispersão de oxigênio de forma homogênea com os componentes do meio de cultura (Cui *et al.*, 1998).

Os fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} foram capazes de produzir protease em menor tempo que o fungo *A. terreus* (Niyonzima e More, 2013), que obteve pico de atividade enzimática após 120 horas de crescimento. O tempo de 72 horas foi ótimo também para a produção de protease por *Aspergillus oryzae* (Sandhya *et al.*, 2005), *A. oryzae* LBA01 (De Castro e Sato, 2014) e por *Chryseobacterium taeanense* TK U001 (Wang *et al.*, 2008), entretanto, *Chryseobacterium taeanense* TK U001 (14 U/mL) teve produção inferior em comparação com *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}.

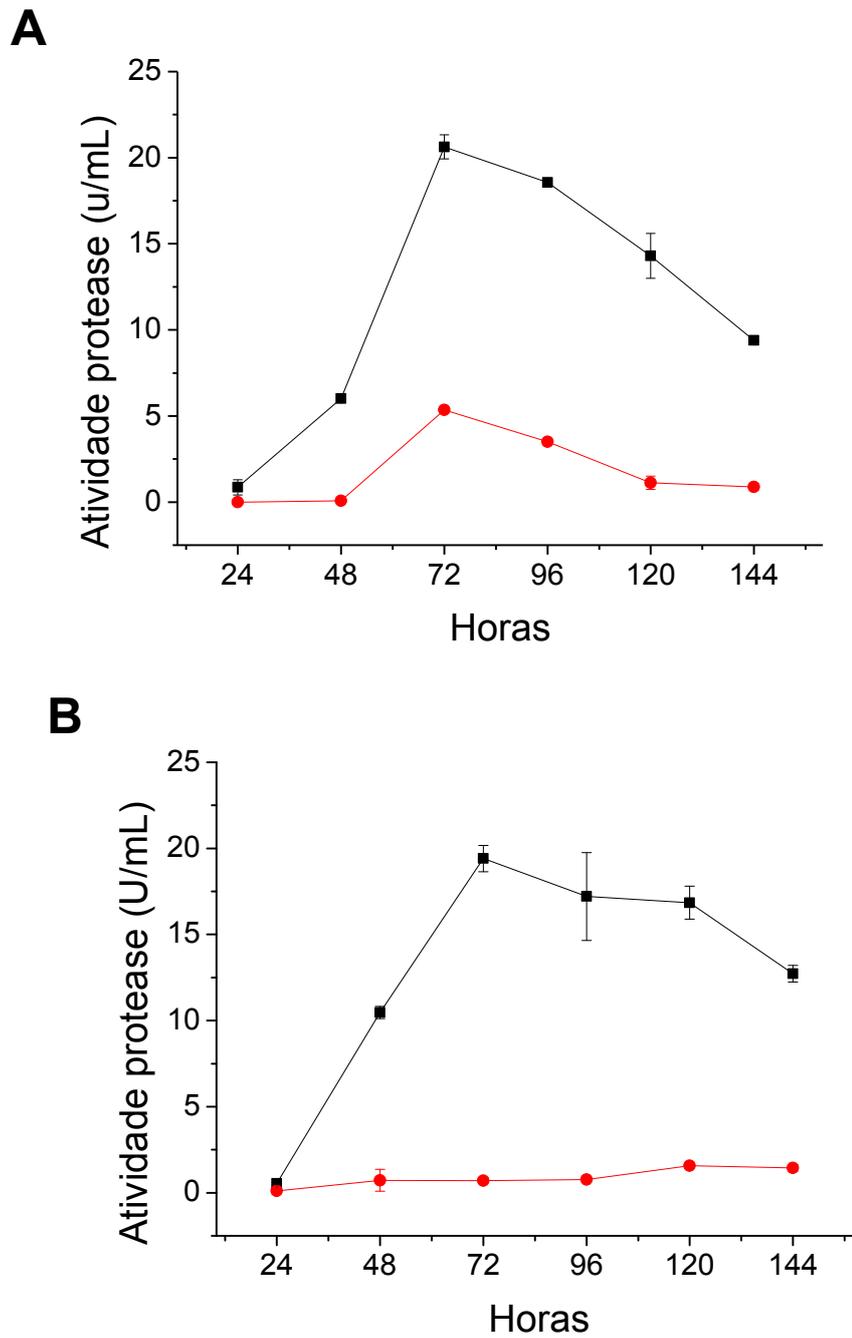


Figura 4. Influência do tempo e condição de crescimento na produção de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* 31 **(B)** *Aspergillus terreus* CM6. Condições: os fungos cresceram em meio líquido Khanna, 1 % da melhor fonte de carbono para cada fungo, a 30°C, durante de 24 a 144 horas, sob condição (■) agitada (110 rpm) e (●) estática.

4.2. Purificação das proteases extracelular

Para o processo de purificação o fungo *Aspergillus terreus*₃₁ foi cultivado em 1L de meio líquido Khanna, com 1 % de farelo de trigo como fonte de carbono, enquanto o fungo *A. terreus*_{CM6} foi cultivado em 500 mL de meio líquido Khanna, com 0.5 % de farelo de trigo + 0.5 % de pena de galinha. O crescimento ocorreu durante 72h, a 30 °C sob condição agitada (110 rpm). Após o tempo de crescimento, os extratos enzimáticos obtidos foram utilizados para dar prosseguimento as etapas de purificação. O resumo das etapas de purificação da protease extracelular produzida pelos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} estão apresentados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Alguns processos cromatográficos foram empregados na tentativa de purificar as proteases dos fungos estudados. As proteases de ambos os fungos não aderiram a coluna a coluna de troca iônica DEAE-celulose, sendo eluída nos primeiros tubos coletados. Subsequentemente, a fração de amostra foi aplicada em coluna Sephadex G-75.

Os valores de purificação foram obtidos a partir da razão entre a atividade específica de uma etapa e a atividade específica da primeira etapa (extrato bruto). Já o rendimento foi calculado a partir da razão entre atividade total de uma etapa e a atividade total da primeira etapa. Os resultados das tabelas 2 e 3 mostram que a purificação da protease do fungo *A. terreus*₃₁ obteve 6.42 % de rendimento e 2.29 de purificação. Já protease *A. terreus*_{CM6} teve rendimento de 1.19 % e, 0.75 de purificação.

Tabela 2. Purificação protease extracelular de *Aspergillus terreus* ₃₁

Etapas Purificação	Proteínas Totais (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	811.03	84843	104.61	1	100
DEAE	143.26	16053	112.05	1.07	18.92
Sephadex G-75	22.75	5443.2	239.24	2.29	6.42

A atividade da protease foi estimada a 50°C em tampão fosfato de sódio 0.05M, pH 6.5.

Tabela 3. Purificação protease extracelular de *Aspergillus terreus* _{CM6}

Etapas Purificação	Proteínas Totais (mg)	Atividade Total (U)	Atividade Específica (U/mg)	Purificação	Rendimento (%)
Extrato Bruto	430.76	23631	54.85	1	100
DEAE	23.31	1247.8	53.53	0.97	5.28
Sephadex G-75	6.80	282.43	41.53	0.75	1.19

A atividade da protease foi estimada a 55°C em tampão fosfato de sódio 0.05M, pH 6.5.

O padrão de purificação das proteases dos fungos *A. terreus* ₃₁ e *A. terreus* _{CM6} foram determinados em gel SDS-PAGE. Como demonstrado figura 5, os procedimentos cromatográficos empregados foram eficientes na purificação da protease produzida para *A. terreus* ₃₁. O peso molecular estimado para essa protease é de aproximadamente 90 kDa. De forma geral, as proteases exibem baixo peso molecular. Serino protease geralmente possuem 18 a 35 KDa, aspártico proteases tem de 30 a 45 KDa, e metaloproteases possuem de 48 a 60 KDa (Rao *et al.*, 1998). Como a protease produzida por *A. terreus* ₃₁, as proteases de *Aspergillus fumigatus* TK U 003, tiveram peso molecular superior a média descrita na literatura, com 124 KDa e 115 KDa (Wang *et al.*, 2005). Na figura 6 podemos observar que o método de purificação não foi tão eficiente para a protease do fungo *A. terreus* _{CM6}. O padrão da amostra semi-purificada apresenta alguns

contaminantes não sendo possível estimar o peso molecular da enzima. Após os processos cromatográficos as proteases de *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} foram caracterizados bioquimicamente.

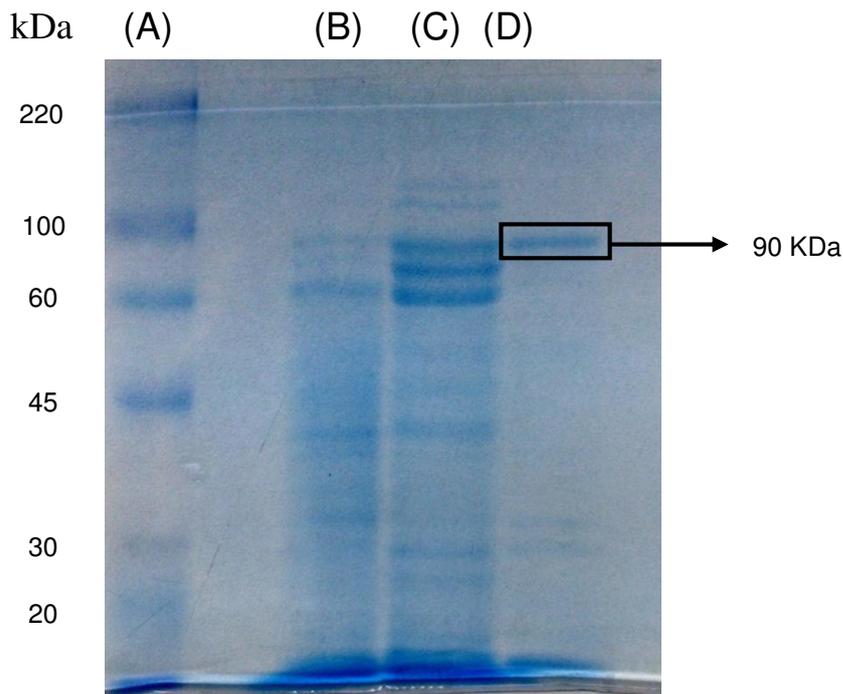


Figura 5. Análise de protease extracelular de *A. terreus*₃₁ em gel SDS-PAGE – 10 %. Canaleta (A) Marcador de peso molecular (Sigma-Aldrich C4861): Miosina (220 kDa), β -Galactosidase (110 kDa), Fosforilase B (60 kDa), Albumina serum bovina (45 kDa) e Anidrase Carbônica (30kDa), (B) Extrato bruto, (C) Amostra pós coluna DEAE-celulose, (D) Amostra pós coluna Sephadex G-75. Colocação com Coomassie Coloidal (Sigma Aldrich).

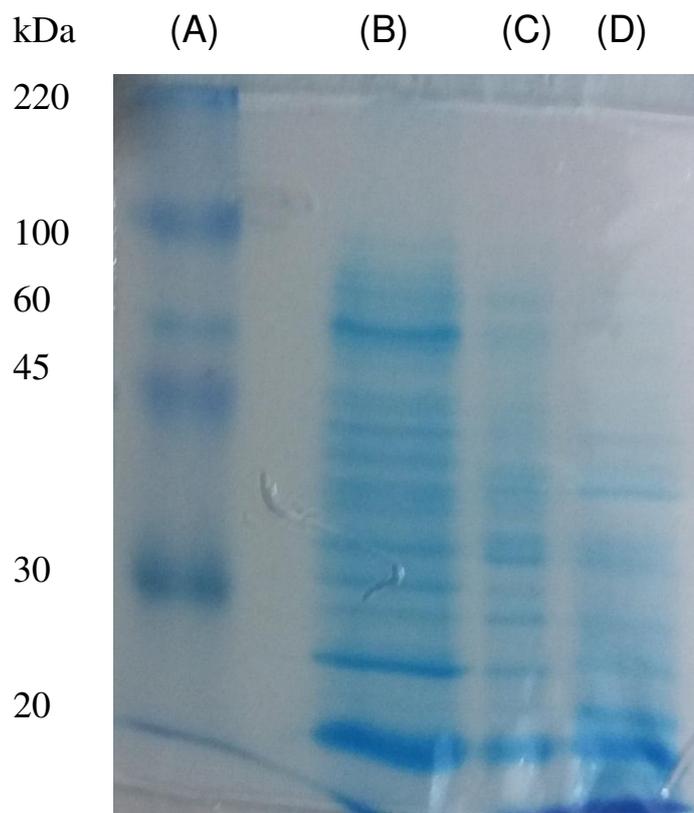


Figura 6. Análise de protease extracelular de *A. terreus* _{CM6} em gel SDS-PAGE – 10 %. Canaleta (A) Marcador de peso molecular (Sigma-Aldrich C4861): Miosina (220 kDa), β -Galactosidase (110 kDa), Fosforilase B (60 kDa), Albumina serum bovina (45 kDa) e Anidrase Carbônica (30kDa), (B) Extrato bruto, (C) Amostra pós coluna DEAE-celulose, (D) Amostra pós coluna Sephadex G-75. Colocação com Coomassie Coloidal (Sigma Aldrich).

4.3. Caracterização Bioquímica das proteases semi-purificadas

4.3.1 Influência da temperatura e estabilidade térmica nas atividades enzimáticas

Para que seja possível o uso industrial, é necessário a caracterização bioquímica da enzima. Condições como temperatura, pH, íons, estabilidade a surfactante e solventes orgânicos podem determinar o sucesso da aplicação da protease na indústria em determinados processos (De Castro e Sato, 2014).

Enzimas aplicadas na industrial, precisam atuar em temperaturas maiores ou menores do que o normal dependendo dos requisitos do processo em que estão envolvidos (Peterson *et al.*, 2009). Especificamente para o uso industrial em detergentes ou para o processamento do couro, a protease precisa ter atividade e estabilidade em temperaturas mais elevadas (Rao *et al.*, 1998). Portanto, avaliamos a influência da temperatura na atividade das proteases em temperaturas de 30 a 70°C. Os resultados mostram que as proteases possuem temperaturas de atividade máxima semelhante (Figura 7A e B). Verifica-se que o pico de atividade ocorreu em temperaturas de 50°C para *A. terreus*₃₁ (Figura 7A), e de 55 °C para *A. terreus*_{CM6} (Figura 7B). Tal diferença de temperatura ótima entre os dois fungos pode ser atribuído ao modo de vida, já que o fungo *A. terreus*₃₁ é endofítico e o fungo *A. terreus*_{CM6} é saprofítico.

Os fungos saprofíticos do gênero *Aspergillus* são capazes de produzir o mais amplo espectro de proteínas e hidrolases que podem ser úteis na hidrólise completa de substratos orgânicos, o que sugere uma maior versatilidade bioquímica. Tal versatilidade pode não resultar na adaptação específica, mas sim refletir na habilidade em explorar recursos temporariamente disponíveis (Leger *et al.*, 1997). De forma geral, dentro do gênero *Aspergillus* as proteases produzidas apresentam temperatura ótima de atividade de 30 a 45°C (Souza *et al.*, 2015). O fungo *A. terreus*_{CM6} apresentou ótima atividade em temperatura superior a outros fungos saprofíticos como *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus niger*, que tiveram máxima atividade de protease em 50 e 45 °C, respectivamente (Devi *et al.*, 2008; Anitha e Palanivelu, 2013). Os fungos termófilos apresentam como característica o crescimento em temperaturas de 40 a 70°C, e consequentemente produção de enzimas termotolerantes. Exemplo seria o fungo termófilo *Myceliophthora* sp. que cresce a 45°C e teve máxima atividade em 50°C. Apesar dos fungos estudados serem mesófilos, com crescimento de 25 a 40°C, houve a

capacidade de produção enzimática consistentes com dados comunicados para enzimas extracelulares de fungos termófilos (Zanphorlin *et al.*, 2010).

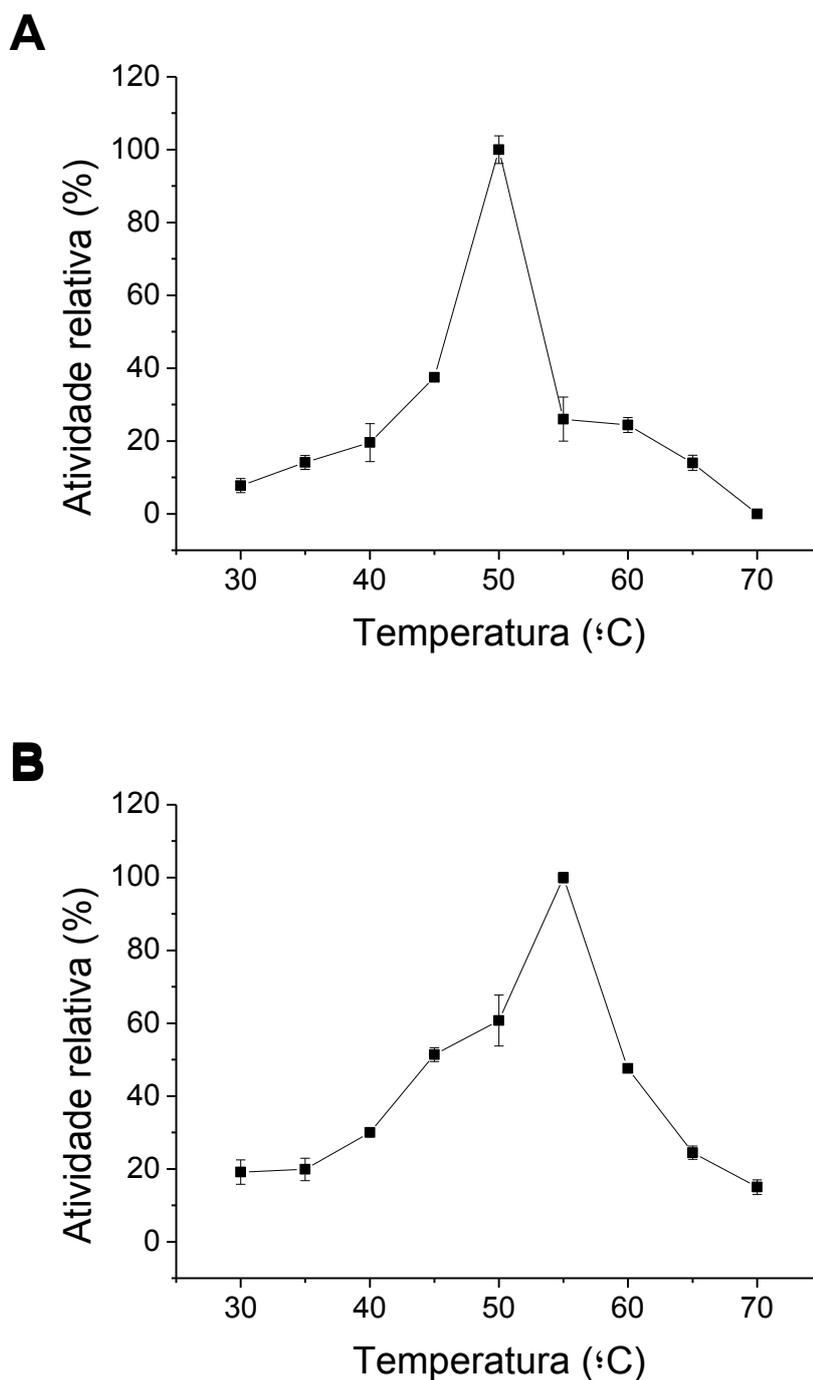


Figura 7. Influência da temperatura sobre a atividade enzimática de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* 31 **(B)** *Aspergillus terreus* CM6. Condições: a atividade de protease foi investigada com a incubação das enzimas em diferentes temperaturas durante 10 minutos. Controle (100 %) temperatura com maior atividade enzimática.

Para avaliar a estabilidade térmica, as enzimas purificadas foram incubadas a temperaturas de 45, 50 e 55 °C, durante 15, 30, 45 e 60 minutos. A atividade residual foi dosada em condições ótimas da enzima. A protease produzida por *A. terreus* 31 (Figura 8A) quando exposta a 45 °C não apresentou redução de atividade mesmo após 60 minutos de incubação, e sob 50 °C manteve atividade média de 75.27 % nos intervalos de tempo avaliados. Já para o fungo *A. terreus* CM6 (Figura 8B) as proteases se mostraram menos estáveis as temperaturas, com queda na atividade residual 55.81 %, mantendo uma média de 52.46 % da atividade nos tempos de 30, 45 e 60 minutos. As proteases produzidas por ambos os fungos mostraram ser mais resistentes a temperaturas quando comparado com a protease de *Aspergillus niger* I1, apresentou queda da atividade relativa residual sob 50 e 60°C após 30 minutos de incubação (Siala *et al.*, 2009).

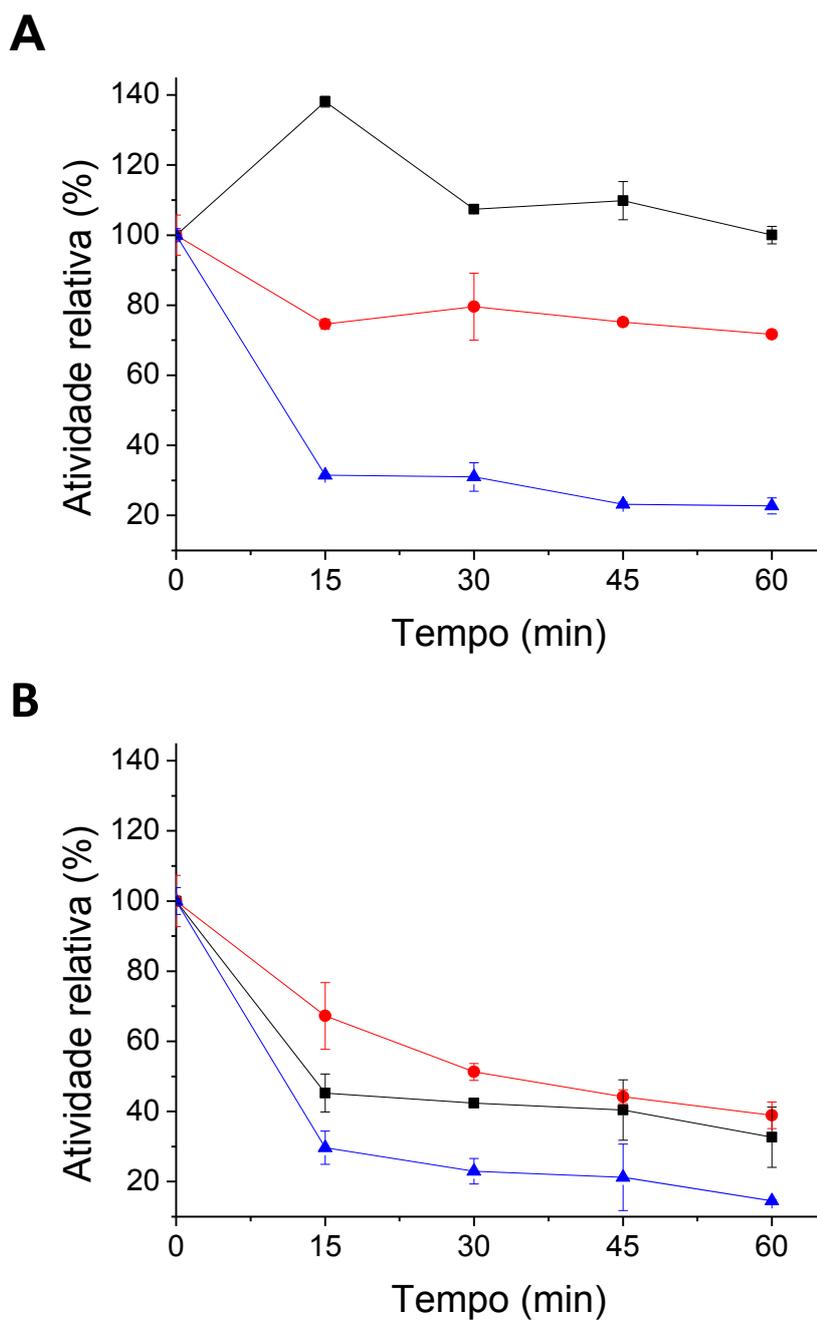


Figura 8. Estabilidade térmica sobre a atividade enzimática de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* ₃₁ **(B)** *Aspergillus terreus* _{CM6}. A estabilidade a temperatura foi determinada com a incubação das enzimas semi-purificadas em temperaturas de (■) 45 °C, (●) 50 °C e (▲) 55 °C por até 60 minutos. A atividade foi mensurada em atividade residual de acordo com as condições de ensaio. A enzima e temperatura ambiente foi considerada como controle (100 %).

4.3.2 Influência do pH e estabilidade ao pH nas atividades enzimáticas

Atividades do processamento de couro submete a pele ou couro a uma ampla gama de alterações de pH (Sreeram e Ramasami, 2003). Logo, determinamos o pH ótimo de atividade proteolítica variando o pH do tampão de reação. Os resultados apresentados na Figura 9 (A e B), mostram que as enzimas são sensíveis a pequenas oscilações de pH, apresentando alta atividade em pH 6.5 para *A. terreus*₃₁ (Figura 9A) e *A. terreus*_{CM6} (Figura 9B). Na literatura, o pH ótimo para atividade de protease dentro do gênero *Aspergillus* está entre pH 6.5 a 7.5 (Souza *et al.*, 2015).

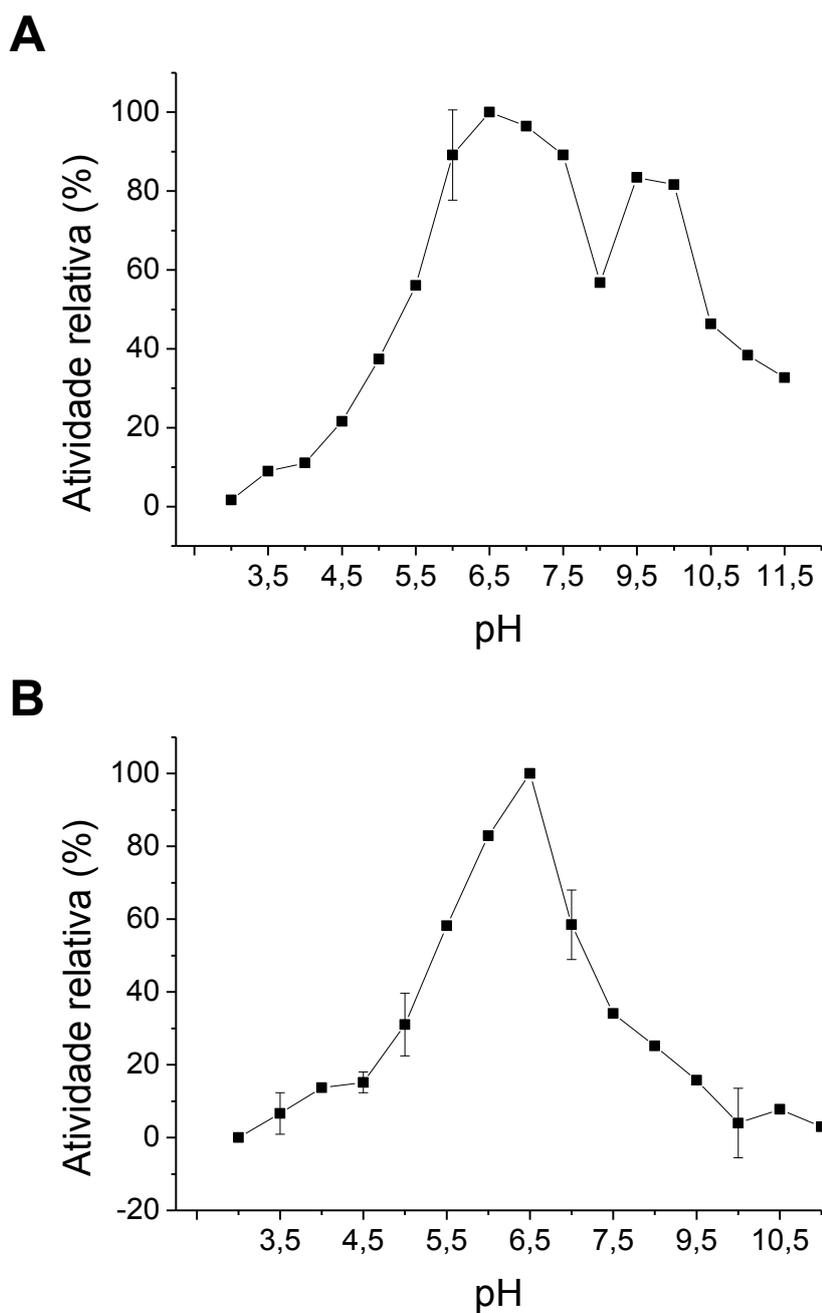


Figura 9. Influência do pH sobre a atividade enzimática de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus*₃₁ **(B)** *Aspergillus terreus*_{CM6}. Condições: A atividade da protease foi estimada a 50 °C para *A. terreus*₃₁ e 55° C para *A. terreus*_{CM6} em tampões McIlvaine (pH 3.5 ao 8.0, incremento de 0.5) e CAPS (pH 9.5, 10.0, 11.0, 11.5, concentração de 100 mM).

Para o teste de influência da estabilidade ao pH sobre a atividade enzimática, as amostras foram incubadas em diferentes pH. Observamos na figura 10 (A e B) que a protease do fungo *A. terreus*₃₁ (Figura 10A) a maior estabilidade ocorreu em pH 6.5 e 7.0, para *A. terreus*_{CM6} (Figura 10B) foi em pH 5.5 a 6.5.

A protease do fungo *A. terreus*₃₁ (Figura 10A) mostrou maior estabilidade em pH 7.5, mantendo 84.81 % da atividade. Entretanto, em pH 5.5 e 6.0 houve queda na atividade enzimática de 36.96 e 20.3 % respectivamente. Já a protease do fungo *A. terreus*_{CM6} (Figura 10B) manteve-se estável de 5.5 a 7.0, perdendo apenas 19.12 % da atividade em pH 7.0, seguido de uma queda de 34.23 % na atividade em 7.5.

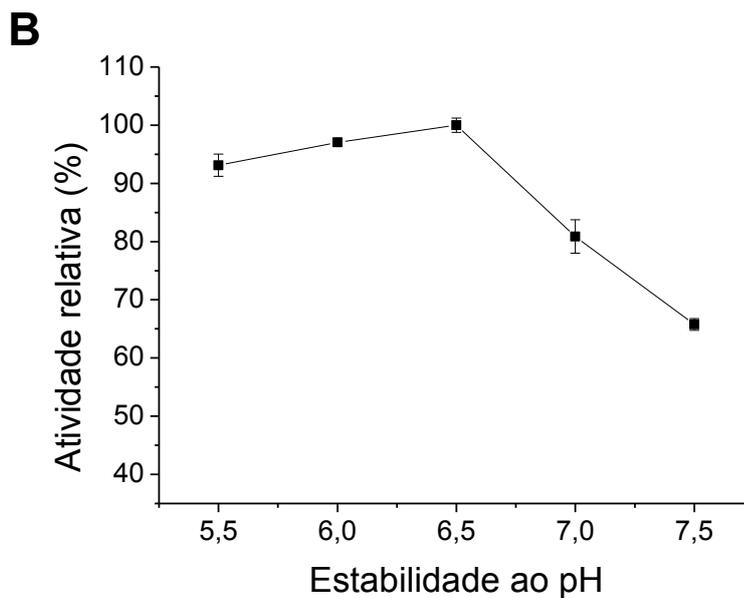
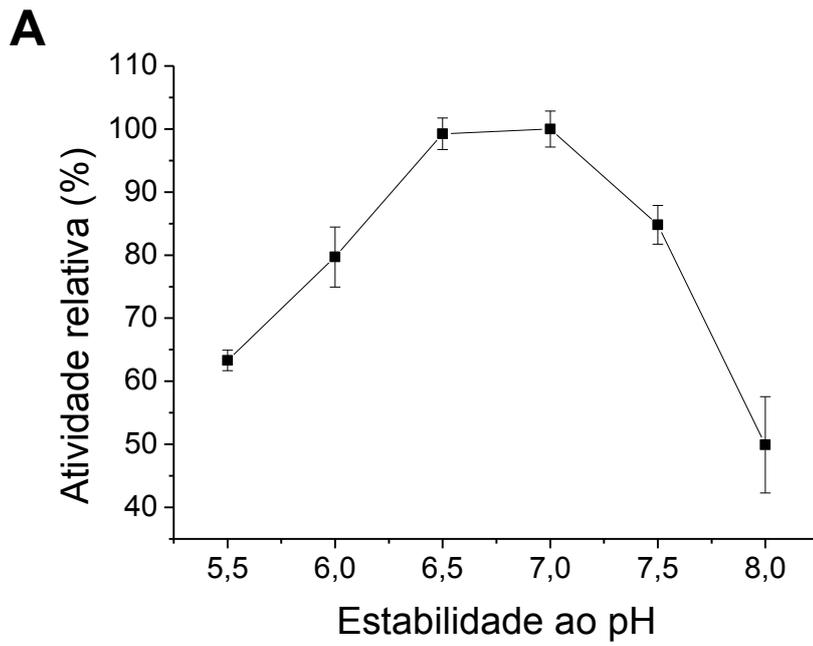


Figura 10. Influência da estabilidade ao pH sobre a atividade enzimática de protease extracelular. **(A)** *Aspergillus terreus* 31 **(B)** *Aspergillus terreus* CM6. Condições: As enzimas foram pré-incubadas durante 1h a 4 °C em pH 5.5, 6.0, 7.0 e 7.5, seguida de dosagem residual. O pH 6.5 foi considerado como controle (100 %).

4.3.3 Efeito de íons metálicos e EDTA nas atividades enzimáticas

Os íons metálicos podem exercer efeito variável sobre a atividade das proteases fúngicas, e podem exercer papel de cofatores para a atividade enzimática (Hsiao *et al.*, 2014). Algumas proteases como as proteases alcalinas, precisam de íons como Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} (Kumar e Takagi, 1999). Para o efeito de íons sobre a atividade proteolítica, as proteases foram incubadas com diferentes íons em concentração de 5 mM. Na tabela 4 podemos observar que as proteases foram estáveis a maioria dos íons testados. O íon FeSO_4 destacou-se como ativador enzimático, aumentando em 109.92 % e 415.84 % a atividade de protease dos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} respectivamente. Já FeCl_2 foi capaz de inibir em 98.6 % da atividade enzimática de *A. terreus*_{CM6}, sendo capaz de inibir bruscamente a atividade da protease de *A. terreus*₃₁, quando comparado com o controle. Apesar de FeSO_4 e FeCl_2 apresentarem Fe, foram capazes de ativar e inibir bruscamente a atividade proteolítica. Resultado semelhante foi encontrado com o fungo *Rhizopus chinensis*, onde a protease foi ativada por FeSO_4 e inibida por $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ (Fukumoto *et al.*, 1967). Em alguns estudos a atividade catalítica foi inibida pela presença de Hg^{2+} (Kumar e Takagi, 1999), e os resultados presentes também demonstram inibição 88.61 % para protease de *A. terreus*₃₁ e 94.06 % para *A. terreus*_{CM6}. O íon MgSO_4 foi capaz de aumentar em 6.11 % a atividade da enzima de *A. terreus*_{CM6} em relação ao controle e inibir 6.95 % para *A. terreus*₃₁. Proteases de *Aspergillus parasiticus* também apresentou aumento de atividade com o íon Mg (5 mM) e redução com Cu^{2+} (5 mM) (Anitha e Palanivelu, 2013). As enzimas foram fracamente inibidas pelo agente quelante EDTA, que em relação ao controle teve queda de apenas 13.74 % na atividade da protease de *A. terreus*₃₁, e 15.26 % na atividade de *A. terreus*_{CM6}, sugerindo que a atividade proteolítica não seja íon dependente.

Tabela 4. Efeito de vários íons na atividade da protease extracelular purificada.

Íons (5 mM)	Atividade Relativa (%)	
	<i>A. terreus</i> ₃₁	<i>A. terreus</i> _{CM6}
Controle	100	100
CoCl ₂	72.09 (±0.6)	88.12 (±2.5)
EDTA	86.26 (±0.6)	84.74 (±2.6)
AgNO ₃	80.91 (±0.6)	77.89 (±0.9)
CuSO₄	72.01 (±0.5)	34.90 (±0.3)
FeCl₂	0.00 (±0.0)	1.40 (±0.2)
CaCl ₂	31.00 (±0.8)	88.78 (±0.5)
ZnCl ₂	81.94 (±0.6)	83.91 (±1.0)
HgCl₂	11.39 (±0.8)	5.94 (±1.5)
AlCl ₃	62.92 (±0.3)	80.86 (±0.6)
MgSO₄	93.05 (±0.8)	106.11 (±1.0)
FeSO₄	209.92 (±1.4)	515.84 (±0.5)
BaCl ₂	99.05 (±1.7)	86.96 (±0.9)
KCl	99.64 (±1.4)	82.01 (±0.0)
(NH ₃)Cl	90.12 (±1.5)	87.95 (±1.9)

Condições: A atividade da protease foi determinada por incubação da enzima purificada na presença de vários íons em pH 6.5; 50°C para *A. terreus*₃₁ e, em 55°C para *A. terreus*_{CM6}. Ensaio sem adição de íons foi considerado como controle (100 %).

4.3.4 Efeito de solventes orgânicos nas atividades enzimáticas

A utilização de enzimas em sistema de solventes orgânicos apresenta vantagens como aumento da solubilidade com substratos hidrofóbicos e eliminação da contaminação microbiana. Entretanto, a atividade catalítica da enzima pode ser prejudicada ou até mesmo inativada. Cada enzima apresenta estabilidade única aos solventes orgânicos, já que a sua estabilidade é influenciada por sua estrutura conformacional (Doukyu e Ogino, 2010). Sendo assim, avaliamos a estabilidade enzimática, onde as proteases foram incubadas em vários solventes orgânicos. A tabela 5 mostra que as protease dos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} mantiveram atividade proteolítica mesmo na presença de metanol, isopropanol, acetona, butanol, acetonitrila e DMSO. A protease do fungo *A. terreus*₃₁ na presença de isopropanol apresentou aumento de 28.59 % na atividade enzimática em relação ao controle, já a protease de *A. terreus*₆ na presença de acetonitrila teve aumento de 12.39 %. A estabilidade aos solventes orgânicos geralmente é atribuída as ligações dissulfeto localizado na superfície da molécula (Doukyu e Ogino, 2010). As proteases dos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} mostraram ter maior estabilidade quando comparada com a protease da bactéria *Chryseobacterium taeanense* TKU00 (Wang *et al.*, 2008) que foi inibida por etanol, butanol e isopropanol, e também a protease do fungo *Myceliophthora* sp. que perdeu atividade enzimática com adição de acetona e butanol (Zanphorlin *et al.*, 2011).

Tabela 5. Efeito de solventes orgânicos na atividade da protease extracelular purificada.

Solventes orgânicos	Atividade relativa (%)	
	<i>A. terreus</i> ₃₁	<i>A. terreus</i> _{CM6}
Controle	100 (± 2.62)	100 (±2.57)
Metanol	117.78 (± 1.19)	104.82 (± 0.95)
Isopropanol	128.59 (± 2.70)	99.83 (± 1.14)
Acetona	104.57 (± 3.51)	100.34 (± 3.72)
Butanol	112.99 (± 1.43)	107.40 (± 3.82)
Acetonitrila	102.91 (±2.29)	112.39 (±2.38)
DMSO	116.22 (±0.68)	103.27 (±1.33)

Condições: As proteases purificadas foram incubadas em temperatura ambiente na presença dos solventes orgânicos a 20 % (v/v). O (C) Controle (sem adição de solvente) foi considerado 100 %, e dosagem da atividade residual em pH 6.5; 50°C para *A. terreus* ₃₁ e, em 55°C para *A. terreus* _{CM6}.

4.3.5 Efeito de surfactantes nas atividades enzimáticas

A atividade enzimática deve ser resistente à ação de surfactantes para a aplicação na depilação do couro (Kanagaraj *et al.*, 2015). O estudo da interferência de surfactantes na atividade proteolítica foi realizado com a incubação das enzimas purificadas em temperatura ambiente durante 1 hora com diferentes surfactantes. Na tabela 6 podemos observar as proteases dos fungos *A. terreus* ₃₁ e *A. terreus* _{CM6} foram resistentes a ação da maioria dos surfactantes, mantendo atividade residual igual ou superior ao controle. Aumento da atividade enzimática pelos surfactantes pode ser atribuída pela melhor acessibilidade com o substrato. Podemos destacar que o DTT foi capaz de aumentar a atividade enzimática em 5.29 e 14.34 % para *A. terreus* ₃₁ e *A. terreus* _{CM6}, respectivamente. O DTT é um agente redutor, e o aumento da atividade pode ser explicado pela redução das ligações dissulfeto, permitindo maior acessibilidade do substrato com o sítio ativo. Apenas os surfactantes CTAB e SDS foram capazes de apresentar efeito desnaturante para ambas as proteases. O CTAB inibiu 10.53 % a atividade da protease de *A. terreus* ₃₁ e 3,21% para *A. terreus* _{CM6}. Já o SDS inibiu 26.71 % da atividade de *A. terreus* ₃₁ e causou inibição completa da atividade de *A. terreus* _{CM6}. O SDS é um surfactante aniônico da classe dos organossulfatos e, o CTAB é um forte surfactante catiônio quaternário a base de amina, ambos com forte efeito desnaturante.

Resultados semelhantes foram encontrados com protease queratinolítica de *Aspergillus parasiticus* que em presença de DTT a 5 e 10mM teve atividade aumentada. SDS e CTAB a 0.5 % inibiu a atividade proteolítica (Anitha e Palanivelu, 2013). Assim como as proteases FI e FII de *Chryseobacterium taeanense* TK U 001, que em concentração de 2% de surfactante também apresentaram atividade da atividade residual de 100 % (FI) e 121 % (FII) em Triton X 100, e 42 % (FI) e 0% (FII) da atividade residual em SDS (Wang *et al.*, 2008).

Tabela 6. Efeito de surfactantes na atividade da protease extracelular purificada.

Surfactantes	Atividade relativa (%)	
	<i>A. terreus</i> ₃₁	<i>A. terreus</i> _{CM6}
Controle	100 (± 2.10)	100 (±2.50)
Tween 60	97.68 (± 0.33)	109.83 (± 0.41)
PEG	98.27 (± 0.26)	113.84 (± 0.82)
Triton X 100	101.84 (± 0.67)	100.70 (± 0.49)
SDS	73.29 (± 1.52)	0
DTT	105.29 (±0.55)	114.34 (± 1.91)
CTAB	89.77 (±3.51)	96.78 (±0.95)

Condições: As proteases purificadas foram incubadas em temperatura ambiente na presença dos surfactantes a 1 % (v/v). O controle (sem adição de surfactante) foi considerado 100 %, e dosagem da atividade residual em pH 6.5; 50°C para *A. terreus* ₃₁ e, em 55°C para *A. terreus* _{CM6}.

4.3.6 Efeito de inibidores nas atividades enzimáticas

O efeito de vários inibidores na atividade proteolítica foi avaliado e está listado na tabela 7. Os resultados demonstraram que a maior redução da atividade proteolítica foi ocasionada por PMSF (10 mM) nas proteases produzidas por *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}, sugerindo que as proteases pertencem a classe de serino protease. O PMSF o inibidor sintético de serino protease, e tem sido aceito em estudos bioquímicos para a investigação do modo de ação enzimático (Fahrney e Gold, 1963). Assim como no efeito da vários íons na atividade da protease extracelular purificada, as enzimas de *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} não apresentaram influência de atividade na presença de EDTA. As proteases também foram resistentes a pepstatina A e β- mercaptoetanol. O EDTA é um agente quelante que inibi a ação de metaloprotease, a pepstatina A, inibe a ação de aspártico proteases por se ligarem irreversivelmente ao aspartato do sítio ativo, e o β-mercaptoetanol, que é um forte agente redutor irreversível que reduz as ligações dissulfeto da enzima. Todos esses resultados sugerem que a enzima não é uma metaloprotease, aspártico protease nem cisteíno protease (Sabotič e Kos, 2012).

Tabela 7. Efeito de inibidores de protease na atividade da protease extracelular purificada.

Inibidores de protease (10mM)	Atividade relativa (%)	
	<i>A. terreus</i> ₃₁	<i>A. terreus</i> _{CM6}
Controle	100	100
PMSF	21,47 (± 1.05)	13,94 (± 3.8)
EDTA	94,48 (± 1.40)	91,77 (± 2.0)
Pepstatina	93,66 (± 1.45)	96,20 (± 2.9)
β-mercaptoetanol	97,14 (± 1.75)	99,84 (± 1.50)

Condições: A atividade da protease foi determinada por incubação da enzima purificada na presença de vários de inibidores de protease (10 mM), sendo o controle (100 %) sem a adição de inibidores. Foi medido a atividade residual em pH 6.5, 50°C para *A. terreus*₃₁ e, em 55°C para *A. terreus*_{CM6}.

4.4 Atividade depilatória e avaliação visual do couro tratado

O processo de depilação enzimática do couro pode ser uma importante alternativa aos métodos químicos no presente cenário onde busca-se a redução dos níveis de toxicidade e rejeito de resíduos nos afluentes (Sivasubramanian *et al.*, 2008). Entretanto, nem todas as proteases podem ser utilizadas no processo de depilação por estar associada a atividade de degradação do colágeno, danificando o tecido (Zambare *et al.*, 2007). Na depilação do couro, a protease age com os componentes da pele, como proteínas de colágeno, queratina e glicoproteínas. Durante o processo de depilação, a raiz do pelo é atacada pela ação proteolítica seletiva da enzima. A capacidade de depilação enzimática está em romper o número de ligações peptídicas que rodeiam a membrana basal do bulbo capilar, que consiste principalmente de proteoglicanos (Senthilvelan *et al.*, 2012).

Fatores como a quantidade de enzima e, o tempo de incubação são importantes no processo de depilação (Senthilvelan *et al.*, 2012). Com o intuito então de avaliar a eficiência da atividade depilatória das proteases produzidas por *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6}, o extrato bruto foi aplicado no couro cru e incubado durante 24 horas com 100 ou 300 U de enzima, e 48 horas com 300 U de enzima. Na figura 12 podemos observar que a protease de *A. terreus*₃₁ após 24 horas com 100 U de enzima (Figura 11B) foi eficiente na depilação do couro, obtendo completa depilação após 48 horas com 300 U de enzima (Figura 11D). Para a protease de *A. terreus*_{CM6} após 48 horas com 300 U (Figura 11D) de enzima houve depilação eficiente do couro.

A maior parte das proteases queratínolíticas pertencem a serino e metaloprotease (Gibson *et al.*, 2013), o que justifica ao fato das proteases dos fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} serem capazes de depilar o couro cru, além de serem inibidas por PMSF ressaltando que pertencem a classe de serino protease.

A depilação enzimática pode ser tão eficiente como o método tradicional (Senthilvelan *et al.*, 2012). Os resultados obtidos indicam que as enzimas brutas dos fungos podem ser aplicadas no processamento do couro em substituinte aos compostos químicos. Resultados semelhantes foram encontrados com o uso do extrato bruto de *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase, onde houve depilação a 30 °C, após 24 horas de incubação em couro bovino (Ghorbel-Bellaaj *et al.*, 2012), com a incubação de proteases alcalinas durante 24 horas houve fácil remoção dos pelos com o auxílio de uma pinça (Abraham *et al.*, 2014). Tais resultados podem contribuir para a futura aplicação de

proteases durante o processo de depilação, e assim, contribui para a diminuição de níveis de nitrogênio e sulfetos descartados no ambiente (Dettmer *et al.*, 2013).

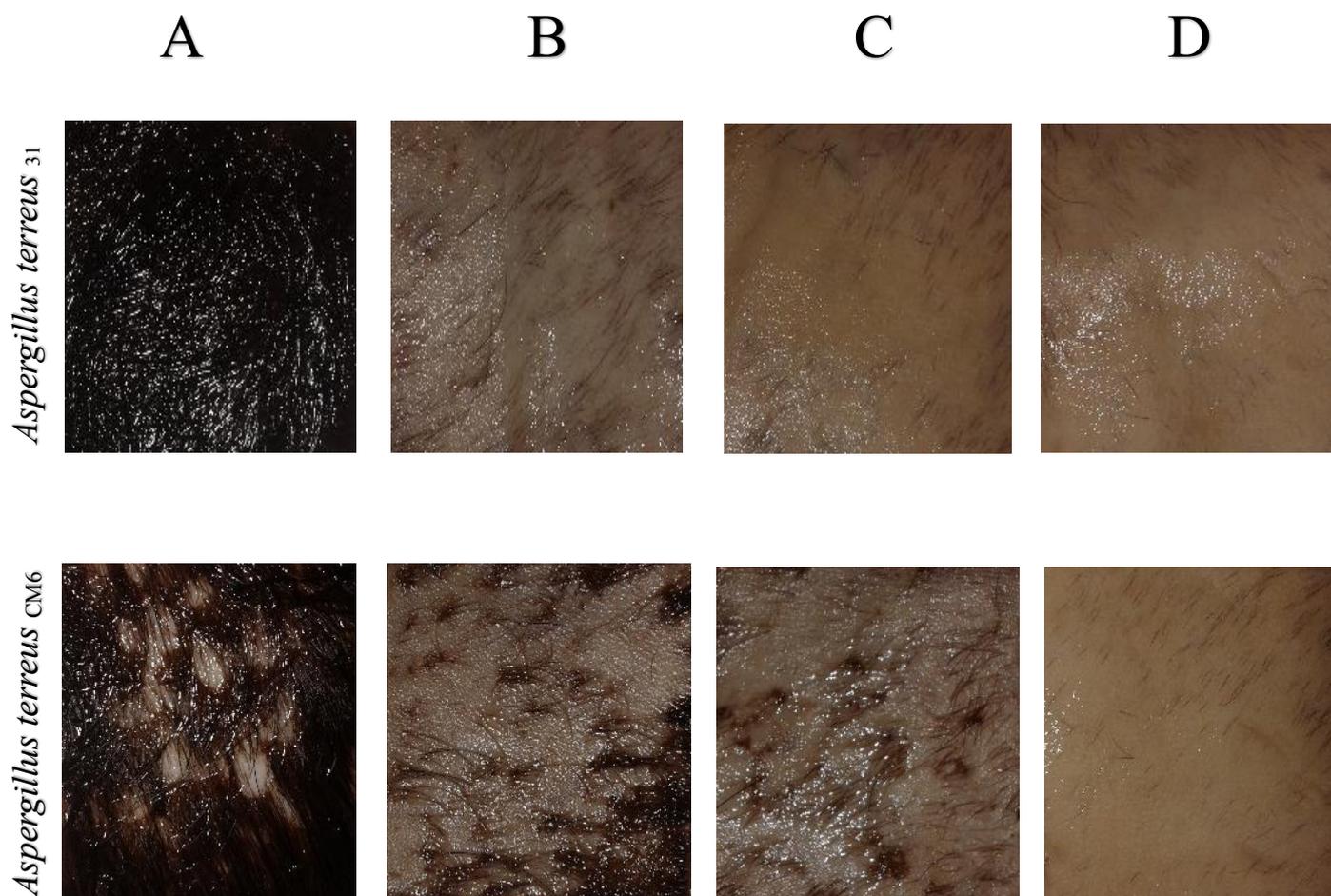


Figura 11. Atividade depilatória de couro bovino cru. (A) Controle: sem enzima; (B) 100 enzima/24h incubação; (C) 300 U enzima/ 24h incubação e (D) 300 U enzima/ 48h incubação. Condições: Os pedaços de pele cru foram incubados com tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6.5, 30°C, sob agitação (50 rpm) e enzimas.

5. CONCLUSÃO

Os estudos demonstraram que os fungos *A. terreus*₃₁ e *A. terreus*_{CM6} foram capazes de produzir protease extracelular em fontes de carbono de origem agroindustrial como farelo de trigo e de pena de galinha. O método de purificação foi eficiente para a protease de *A. terreus*₃₁, necessitando da aplicação de outros métodos cromatográficos para a purificação de *A. terreus*_{CM6}. Embora as proteases extracelulares serem produzidas por fungos da mesma espécie, houve diferenças nas características bioquímicas, indicando diferença genética entre os isolados. Devido a inibição por PMSF, as proteases foram classificadas como serino protease, e apresentaram pH 6.5 como ótimo para atividade enzimática. A estabilidade ocorreu em pH 6.5 - 7.0 para *A. terreus*₃₁, e pH 5.5 – 6.5 para *A. terreus*_{CM6}, havendo ativação da atividade proteolítica com a adição de FeSO₄. As enzimas tiveram atividade ótima em temperaturas de 50°C (*A. terreus*₃₁) e 55° C (*A. terreus*_{CM6}), e foram resistentes a diversos solventes orgânicos (metanol, isopropanol, acetona, butanol, acetonitrila e DMSO) e surfactantes (Tween 60, PEG, Triton X 100 e CTAB). Ambas as proteases tiveram sucesso na depilação do couro cru utilizando extrato bruto com 300 U de enzima, após 48 horas de incubação. Podem ser potencialmente úteis na indústria do couro, sendo possível alternativa a redução da poluição ambiental.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELLA, A. et al. Production of β -glucosidase from wheat bran and glycerol by *Aspergillus niger* in stirred tank and rotating fibrous bed bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p.1331-1337, 2016, ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316302471> >.

ABRAHAM, J.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 74, p. 191-198, 7/1/2014. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261400256X> >.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v. 88, n. 2, p. 214-220, 4// 2013. ISSN 1046-5928. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1046592813000089> >.

BERTSCH, A.; COELLO, N. A biotechnological process for treatment and recycling poultry feathers as a feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 15, p. 1703-1708, 10// 2005. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405000374> >.

BUDAK, S. O. et al. A genomic survey of proteases in *Aspergilli*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-523> >.

CELESTINO, J. D. R. et al. *Aspergillus* 6V4, a strain isolated from manipueira, produces high amylases levels by using wheat bran as a substrate. **Enzyme research**, v. 2014, 2014. ISSN 2090-0406.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 8// 2003. ISSN 0958-1669. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166903000995> >.

CORRÊA, R. C. G. et al. Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 41, n. 10, p. 1467-1478, 2014. ISSN 1476-5535. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2> >.

CRIPWELL, R. et al. Utilisation of wheat bran as a substrate for bioethanol production using recombinant cellulases and amylolytic yeast. **Applied Energy**, v. 160, p. 610-617, 12/15/ 2015. ISSN 0306-2619. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0306261915011691> >.

CUI, Y.; VANDER LANS, R.; LUYBEN, K. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, n. 4, p. 409-419, 1998. ISSN 0006-3592.

DAS, A. et al. Production of cellulolytic enzymes by *Aspergillus fumigatus* ABK9 in wheat bran-rice straw mixed substrate and use of cocktail enzymes for deinking of waste office paper pulp. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 290-296, 1// 2013. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852412015829> >.

DE CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: An evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 20-25, 7// 2014. ISSN 1878-8181. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818113001485> >.

DETTMER, A. et al. Environmentally friendly hide unhairing: enzymatic hide processing for the replacement of sodium sulfide and delimid. **Journal of Cleaner Production**, v. 47, p. 11-18, 5// 2013. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652612002119> >.

DEVI, M. K. et al. Purification, characterization of alkaline protease enzyme from native isolate *Aspergillus niger* and its compatibility with commercial detergents. **Indian journal of science and technology**, v. 1, n. 7, p. 1-6, 2008. ISSN 0974-5645.

DIXIT, S. et al. Toxic hazards of leather industry and technologies to combat threat: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 87, p. 39-49, 1/15/ 2015. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652614010580> >.

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270-282, 2/15/ 2010. ISSN 1369-703X. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X09002964> >.

FAHRNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 7, p. 997-1000, 1963/04/01 1963. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1021/ja00890a037> >.

FANG, Q.-H.; ZHONG, J.-J. Effect of initial pH on production of ganoderic acid and polysaccharide by submerged fermentation of *Ganoderma lucidum*. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 769-774, 2// 2002. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959201002783> >.

FLEIßNER, A.; DERSCH, P. Expression and export: recombinant protein production systems for *Aspergillus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 4, p. 1255-1270, 2010. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-010-2672-6> >.

FUKUMOTO, J.; TSURU, D.; YAMAMOTO, T. Studies on Mold Protease. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 31, n. 6, p. 710-717, 1967/06/01 1967. ISSN 0002-1369. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1967.10858863> >.

GHORBEL-BELLAAJ, O. et al. *Pseudomonas aeruginosa* A2 elastase: Purification, characterization and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 679-686, 4/1/ 2012. ISSN 0141-8130. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813012000529> >.

GIBSON, B.; HASSAN, S.; TANSEY, J. **Sustainability assessment: criteria and processes**. Routledge, 2013. ISBN 1136556095.

CHRISTOPHER, J. G. et al. Cohesive system for enzymatic unhairing and fibre opening: an architecture towards eco-benign pretanning operation. **Journal of Cleaner Production**, v. 83, p. 428-436, 11/15/ 2014. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652614007471> >.

HARANGOZÓ, G.; ZILAHY, G. Cooperation between business and non-governmental organizations to promote sustainable development. **Journal of Cleaner Production**, v. 89, n. s/n, p. 18-31, 2/15/ 2015. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652614011640> >.

HARUTA, S. et al. Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 1-11, 1// 2005. ISSN 1389-1723. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172305003221> >.

HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ, E. M. et al. Xylanases, cellulases, and acid protease produced by *Stenocarpella maydis* grown in solid-state and submerged fermentation. **BioResources**, v. 9, n. 2, p. 2341-2358, 2014. ISSN 1930-2126.

HSIAO, N.-W. et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89-94, 2014. ISSN 0717-3458.

HUNG, L.-L.; TRAPPE, J. M. Growth variation between and within species of ectomycorrhizal fungi in response to pH in vitro. **Mycologia**, p. 234-241, 1983. ISSN 0027-5514.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 3// 2013. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095965261200594X> >.

KANAGARAJ, J. et al. Eco-friendly waste management strategies for greener environment towards sustainable development in leather industry: a comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 89, p. 1-17, 2/15/ 2015. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652614011858> >.

KANTH, S. V. et al. Cleaner tanning practices for tannery pollution abatement: Role of enzymes in eco-friendly vegetable tanning. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, n. 5, p. 507-515, 3// 2009. ISSN 0959-6526. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959652608002333> >.

KHAN, F. New microbial proteases in leather and detergent industries. **Innovative Research in Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2013.

KHANNA, P.; SUNDARI, S. S.; KUMAR, N. J. Production, isolation and partial purification of xylanases from an *Aspergillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 242-243, 1995. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00704661> >.

KOVAČEC, E.; LIKAR, M.; REGVAR, M. Temporal changes in fungal communities from buckwheat seeds and their effects on seed germination and seedling secondary metabolism. **Fungal Biology**, v. 120, n. 5, p. 666-678, 5// 2016. ISSN 1878-6146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187861461630006X> >.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, v. 17, n. 7, p. 561-594, 12/15/ 1999. ISSN 0734-9750. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975099000270> >.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 08/15/ 1970. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/227680a0> >.

LEGER, R. J. S.; JOSHI, L.; ROBERTS, D. W. Adaptation of proteases and carbohydrases of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. **Microbiology**, v. 143, n. 6, p. 1983-1992, 1997. Disponível em: < <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-143-6-1983> >.

LOFRANO, G. et al. Chemical and biological treatment technologies for leather tannery chemicals and wastewaters: A review. **Science of The Total Environment**, v. 461-462, p. 265-281, 9/1/ 2013. ISSN 0048-9697. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969713005470> >.

LOWRY, O. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265-75, 1951.

MACCHERONI JR, W.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L. Ambient pH-regulated enzyme secretion in endophytic and pathogenic isolates of the fungal genus *Colletotrichum*. **Scientia agricola**, v. 61, n. 3, p. 298-302, 2004. ISSN 0103-9016.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. et al. Secreted fungal aspartic proteases: A review. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 33, n. 2, p. 76-82, 4// 2016. ISSN 1130-1406. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140616000048> >. Acesso em: 2016/6//.

MELLO, C. S. M., A. REIS; J. B. T. da SILVA. **Manual de curadores de germoplasma–Micro-organismos: Fungos Filamentosos**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2011.

MORERA, J. M. et al. Minimization of the environmental impact of chrome tanning: A new process with high chrome exhaustion. **Chemosphere**, v. 69, n. 11, p. 1728-1733, 11// 2007. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507007424>>.

MUKHTAR, H.; HAQ, I. Comparative Evaluation of agroindustrial byproducts for the production of alkaline protease by wild and mutant strains of *Bacillus subtilis* in submerged and solid state fermentation. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. S. Screening and optimization of cultural parameters for an alkaline protease production by *Aspergillus terreus* gr. under submerged fermentation. **Int J Pharm Bio Sci**, v. 4, n. 1, p. 1016-1028, 2013.

NOGUEIRA, S. D. C. P. et al. Laccase production by *Aspergillus niveus* on SSF using wheat bran as alternative carbon source and its synergistic effect on pulp biobleaching using a mix of laccase/xylanase from the same microorganism. **Journal of Biochemical Technology**, v. 6, n. 2, p. 929-937, 2015. ISSN 0974-2328.

OYELEKE, S.; EGWIM, E. C.; AUTA, S. Screening of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* strains for extracellular protease enzyme production. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**, v. 2, n. 7, p. 83-87, 2010. ISSN 2141-2308.

PANDEETI, E. V. P. et al. Enzymatic Depilation of Animal Hide: Identification of Elastase (LasB) from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327 as a Depilating Protease. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16742, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016742>>.

PASQUALONE, A. et al. Functional, textural and sensory properties of dry pasta supplemented with lyophilized tomato matrix or with durum wheat bran extracts produced by supercritical carbon dioxide or ultrasound. **Food Chemistry**, v. 213, p. 545-553, 12/15/ 2016. ISSN 0308-8146. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814616310287>>.

PEREIRA, N.; BON, E.; FERRARA, M. Séries em biotecnologia: Tecnologia de bioprocessos. **Esc. Quím./UFRJ, Rio de Janeiro**, p. 26, 2008.

PETERSON, R. et al. Fungi from koala (*Phascolarctos cinereus*) faeces exhibit a broad range of enzyme activities against recalcitrant substrates. **Letters in applied microbiology**, v. 48, n. 2, p. 218-225, 2009. ISSN 1472-765X.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Statistical optimization of production, purification and industrial application of a laundry detergent and organic solvent-stable subtilisin-like serine protease (Alzziprase) from *Bacillus subtilis* DM-04. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 2, p. 173-180, 1/15/ 2010. ISSN 1369-703X. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369703X09002940>>.

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. ISSN 1092-2172.

RODRIGUES MARCONDES, N. et al. New Feather-Degrading Filamentous Fungi. **Microbial Ecology**, v. 56, n. 1, p. 13-17, 2008. ISSN 1432-184X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-007-9319-x> >.

ROPARS, J. et al. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. **International Journal of Food Microbiology**, v. 155, n. 3, p. 199-210, 4/16/ 2012. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512000852> >.

SABOTIČ, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors—current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1351-1375, 2012. ISSN 1432-0614. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-011-3834-x> >.

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, 7// 2005. ISSN 1359-5113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0032959205000026> >.

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University, v. 275, n. 12, p. 25-55, 1989.

SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; MANDAL, A. B. Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 14, n. 5, p. 889-897, 2012. ISSN 1618-9558. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s10098-012-0458-5> >.

SIALA, R. et al. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* II: purification and characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 18, 2009. ISSN 1684-5315.

SIVASUBRAMANIAN, S. et al. Ecofriendly lime and sulfide free enzymatic dehairing of skins and hides using a bacterial alkaline protease. **Chemosphere**, v. 70, n. 6, p. 1015-1024, 1// 2008. ISSN 0045-6535. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507011605> >.

SOUZA, P. M. D. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. ISSN 1517-8382.

SREERAM, K. J.; RAMASAMI, T. Sustaining tanning process through conservation, recovery and better utilization of chromium. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 38, n. 3, p. 185-212, 6// 2003. ISSN 0921-3449. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921344902001519> >.

VANDAMME, E. J. Agro-industrial residue utilization for industrial biotechnology products. In: (Ed.). **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**: Springer, 2009. p.3-11.

VELOORVALAPPIL, N. J. et al. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 2013, 2013. ISSN 2328-4854.

VERMA, S.; DIXIT, R.; PANDEY, K. C. Cysteine Proteases: Modes of Activation and Future Prospects as Pharmacological Targets. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 107, 04/25

02/23/received

04/08/accepted 2016. ISSN 1663-9812. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4842899/> >.

WANG, S.-L. 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, 4/1/ 2005. ISSN 0141-0229. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022904003989> >.

WANG, S.-L. et al. Optimization of conditions for protease production by *Chryseobacterium taeanense* TKU001. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 9, p. 3700-3707, 6// 2008. ISSN 0960-8524. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852407005706> >.

WANG, T.-H.; LU, S. Production of xylooligosaccharide from wheat bran by microwave assisted enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1531-1535, 6/1/ 2013. ISSN 0308-8146. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612016160> >.

YIKE, I. Fungal Proteases and Their Pathophysiological Effects. **Mycopathologia**, v. 171, n. 5, p. 299-323, 2011. ISSN 1573-0832. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11046-010-9386-2> >.

ZAFERANLOO, B. et al. Optimization of protease production by endophytic fungus, *Alternaria alternata*, isolated from an Australian native plant. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 6, p. 1755-1762, 2014. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-014-1598-z> >.

ZAMBARE, V. P.; NILEGAONKAR, S. S.; KANEKAR, P. P. Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 11, p. 1569-1574, 2007. ISSN 1573-0972. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-007-9402-y> >.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochem**, v. 46, n. 11, p. 2137-2143, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.014>>.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **The Journal of Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 331-336, 2010. ISSN 1976-3794. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s12275-010-9269-8> >.

Anexo



Biochemical Properties of an Serine Protease from *Aspergillus flavus* and application in leather hairing

Journal:	<i>Biocatalysis and Biotransformation</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Franco, Daniel; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Spalanzani, Regiane; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Lima, Emmly; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Marchetti, Clarice; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Silva, Patricia; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS Masui, Douglas; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS giannes, giovana; UFMS, not ZANOELO, FABIANA; Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, CCBS
Keywords:	<i>Aspergillus flavus</i> , serine protease, purification, immobilization, leather hairing

SCHOLARONE™
Manuscripts

Biochemical Properties of an Serine Protease from *Aspergillus flavus* and application in leather hairing

¹Daniel Guerra Franco, ¹Regiane Nogueira Spalanzani ¹Emmly Ernesto Lima, ¹Clarice Rossato Marchetti, ¹Patrícia Oliveira Silva, ¹Douglas Chodi Masui, ¹Giovana Cristina Giannesi and ¹Fabiana Fonseca Zanoelo.

¹Laboratory of Biochemistry and Microorganisms, CCBS - Federal University of Mato Grosso of Sul/UFMS, Av Costa e Silva s/n°, 79070-900 Campo Grande, MS, Brazil

Corresponding author: Fabiana Fonseca Zanoelo. Laboratory of Biochemistry and Microorganisms, Federal University of Mato Grosso of Sul, 79070-900, Campo Grande, MS Brazil. Tel: +55 67 3345 7959 *E-mail address:* ffzanoelo@hotmail.com

Abstract

Proteases are enzymes produced by several filamentous fungi with important biotechnological applications. In this work, an protease from *Aspergillus flavus* was characterized. The culture filtrate of *A. flavus* was purified to homogeneity by Sephacryl S-200 column chromatography followed by CM-cellulose. The molecular weight of the purified enzyme was estimated to be approximately 32 kDa by SDS-PAGE. Optima of temperature and pH were 55 °C and 6.5, respectively. The enzyme was stimulated by Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} and inhibited by Hg^{2+} and Ag^{2+} and Cu^{2+} . The protease showed increased activity with detergents Tween 80 and Triton X, and was stable at reducing agents β -mercaptoethanol. The protease activity was strongly inhibited in the presence of PMSF indicating it is a serine protease. The enzyme entrapped in calcium alginate beads retained its activity for longer time and can reused up to 10 times. The thermo stability was increased after the immobilization retained 100 % of activity at 45 °C after 60 minutes of incubation, and 90 % of residual activity at 50 °C after 30 minutes. In contrast, the enzyme free only retained 10 % of its residual activity after 60 minutes at 50 °C. The remarkable properties such as temperature, pH and immobilization stability found with this enzyme assure that it could be a potential candidate for industrial applications.

Keywords: *Aspergillus flavus*, serine protease, purification, immobilization, leather hairing

Introduction

Proteases are hydrolytic enzymes which promote the cleavage of peptide bonds from proteins and therefore play a vital role in various industrial applications (Pant et al. 2015). These proteases are widely used in detergents, pharmaceuticals, leather and the food and agriculture industries (Rao et al. 1998; Azzoni et al. 2005; Castro et al. 2014; Vijayaraghavan et al. 2014; Pant et al. 2015; Vojcic et al. 2015). In the leather industry, the proteases promotes swelling of the skin, hair removal and maceration (softening) (Rao et al. 1998, Zanoelo et al 2013). Conventional methods used in leather processing involve toxic chemicals such as sodium sulfide, thus the use of proteases as alternatives to chemicals has proved successful in improving leather quality and in reducing environmental pollution (Paul et al. 2016). The proteases represent approximately 60% of the total worldwide enzymes sales (Zambare et al. 2011, Ghareib et al 2014). Proteases are found in a wide diversity of sources such as animals, plants and microorganisms. Many microorganisms secrete proteases to the external environment in order to degrade proteins whose hydrolysis products serve as a source of nitrogen and amino acids. In case of filamentous fungi the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* stand out by the ability to produce proteases because fungi can grow on low costs substrates

(Zanoelo et al. 2013). Filamentous fungi, such as *Aspergillus* have been the organism of choice for large scale production of bulk industrial enzymes. Several factors can affect the stability of microbial proteases in industrial processes, including microorganism strain, purification process, substrate, temperature and pH (Pant et al. 2015; Castro et al. 2014; Waghmare et al. 2015). On the other hand, some problems such as the high production cost, the poor stability for a long time of storage, pH and thermal stability of the enzyme, and the difficulty in recovery, should be overcome in order to industrially apply them biotechnological process. Thus different measures have been taken to reduce the cost and increase the utilization of proteases. The utilization of agricultural residues to produce high quantities of the enzyme might to reduce the production costs resulting in a cheaper product and processes (Silva et al. 2013; Guimarães et al. 2013). Moreover, the use of immobilized enzymes in industrial processes provide many important advantages, mainly the reutilization of the immobilized enzyme in a continuous operation (Guisan et al. 2006; Zanphorlin et al. 2010, Benassi et al. 2013). The enzyme immobilization can be performed using various reversible soluble-insoluble polymers. The enzyme entrapment in calcium alginate has been the enzyme immobilization method more explored, because some characteristics can be observed as the protein stabilization in solution by the prevention of the oxidation, aggregation, increase of the thermostability and others (Benassi, et al. 2013). The present study had the objective of optimize the conditions for the production, purification, biochemical characterization and immobilization of the extracellular protease from *Aspergillus flavus*, and use the enzyme in the process of the leather dehairing.

Material and Methods

Microorganism

Aspergillus flavus was isolated from soil samples in Campo Grande region, MS, Brazil (coordinated 20.436589 S, -54.736698 W), identified and deposited in the University Recife Mycology – URM (PE, Brazil) under number (7326). Stock cultures were grown on Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid, UK) medium slants, at 30°C, for 5-7 days and subsequent stored at 4°C.

Culture conditions and protease production

To protease production, the mycelium was suspended in 10 mL of sterilized water, and approximately 10^7 conidia from 7-day-old cultures were inoculated into 125 mL Erlenmeyer flasks, containing 25 mL of medium liquid (Khanna), supplemented with desired dry carbon sources (Rice bran, Triturated rice, Rice straw, Chicken feather, Wheat bran, Corn cob, Soybean meal, and Sugarcane bagasse). The culture of fungi was supplemented with different nitrogen sources (casein, peptone, urea, egg

1
2
3
4 albumin, yeast extract, meat extract, ammonium sulfate, and sodium nitrate). The influence of the medium pH and the static or
5
6 agitated (100 rpm) cultivation were also evaluated to the maximal enzyme production. The cultures were incubated at 30 °C,
7
8 during different periods (24-168 h). After the maximal production of protease, the medium was subsequently vacuum-filtered
9
10 using filter paper (Whatman n°1) and the crude filtrate was used for the study of the extracellular enzyme.

11 12 13 14 15 **Protease assay and protein determination**

16
17
18 b-Glucosidase was routinely assayed in McIlvaine

19
20 buffer

21 [13], pH 6.5, at 60 °C, using

22
23 The protease activity was assayed according to Sarath et al (2001) with modifications. The enzyme activity was measured
24
25 discontinuously, at 55 °C, in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, containing 1% (w/v) of casein as the substrate, in a final
26
27 volume of 1025 µL. The reaction was initiated by the addition of 25µL of the crude extract or purified enzyme. After 30 min of
28
29 enzyme incubation, the reaction was stopped using 0.5 mL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA). The samples were
30
31 centrifuged at 8.000 rpm, 10 min, and the absorbance of the supernatant was determined at 280 nm using the Genesys 10S UV-
32
33 VIS spectrophotometer (Thermo Scientific, USA). To the control samples, the TCA solution was added before the addition of
34
35 the enzyme solution. One enzyme unit (1 U) was defined as the amount of enzyme that release of 1.0 µmol of tyrosine per min
36
37 under assay conditions (Gupta et al. 2002). Protein content was estimated by the Lowry method (1951), using bovine serum
38
39 albumin as standard. Specific activity was defined as U/mg protein.

40 41 42 **Purification of protease**

43
44 The crude extract rich on protease was dialyzed exhaustively against water and lyophilized. The dialyzed sample was
45
46 resuspended in 100 mM sodium phosphate, pH 7.0 containing 100mM NaCl, and applied onto a Sephacryl S-200 column (3.0
47
48 x 60 cm) (Sigma-Aldrich, USA), equilibrated and eluted with the same buffer at a flow rate of 0.1 mL/min. Active fractions
49
50 were pooled, dialyzed overnight against 50 mM sodium sodium acetate buffer, pH 4.5, and applied onto a CM-cellulose
51
52 column (2.0 x 6.5 cm) equilibrated with the same buffer, and eluted at a flow rate of 0.2 mL/min with a sodium chloride linear
53
54 gradient from 0 to 1.0 M. Active fractions were pooled, dialyzed against distilled water, lyophilized and dissolved in a small
55
56 volume of distilled water.

Polyacrylamide gel electrophoresis

SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (1970), using 10 % acrylamide, using phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovoalbumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa), bovine milk α -lactalbumin (14 kDa) as molecular mass standard (Sigma-Aldrich, USA). After the runs the gels were stained with silver nitrate.

Effect of pH and temperature on protease activity

Optimum pH was determined by performing standard activity assays in pH range from 3.5 to 7.0 using McIlvaine buffer, at 30 °C. To determine optimal temperature, the enzymatic assay was carried out at different temperatures (30 at 65 °C) at pH 6.5.

Effect of substances on stability of protease

The effect of different substances (surfactants, organic solvents) or metal ions on protease activity were performed in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5. The effect of some surfactants (10 %, v/v) on the enzymatic activity such as SDS (Sodium dodecyl sulphate), Tween 80 (Polysorbate 80), PEG (Polyethylene glycol), Triton X-100 (Poly ethylene glycol tert-octylphenyl ether), CTAB (Cetyl trimethyl ammonium bromide) and the organic solvents (10 % v/v) such as methanol, DMSO, acetone, isopropanol, acetonitrile and butanol were analyzed mixing the enzyme with the surfactants or organic solvents were performed at 50 °C for 1 h. After this period, the residual activity was measured according to the standard enzyme assay.

The effects of inhibitors or reducing agents on protease activity were studied using PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride), EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid), Pepstatin, β -mercaptoetanol and DTT (Dithiothreitol) at a final concentration of 10 mM. The enzyme was pre-incubated with inhibitor or reducing agents for 10 min at room temperature and then the remaining enzyme activity was determinate.

The influence of metal ions on protease activity was investigated under standard assay condition in the presence of 5 mM of metal ions (Ca^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , K^{+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+}). The effect of NaCl concentration on enzyme activity was determined by incubation of the enzyme at different NaCl concentrations (0-20 %, w/v) for 1 h at room temperature. After incubation the aliquots were assayed for residual activity. The enzyme without additions any substance was considered as 100 % (control).

Dehairing ability test

1
2
3
4 Cow skin was cut to pieces (5 x 5 cm) and incubated in phosphate buffer pH 6.5 with 100, 300 and 900 U of the protease for
5
6 24 h at 30°C under orbital agitation (50 rpm) condition. The skin pieces were virtually analyzed for the dehairing ability as
7
8 described by Huang et al (2003) with modifications. Skin pieces in phosphate buffer pH 6.5 without the protease were used as
9
10 controls.

11 12 13 **Enzyme Immobilization in alginate**

14 **Immobilization in alginate**

15
16
17 An aliquot of 1mL of purified Protease was mixed with 2% sodium alginate solution in 1:1 ratio. The mixture was
18
19 taken into a syringe, and beads were formed by dropping the solution into 0.1 M calcium chloride. The beads were maintained
20
21 in continuous shaking for 2 h. The beads were washed 3-4 times with distilled water and subsequently filtered using filter
22
23 paper (Whatman n°1). The beads were dried and weighed for further studies.

24 25 26 **Reusability of protease immobilized in the alginate beads**

27
28 To test the stability of the protease entrapped in the Ca-alginate beads, the beads were used several times for the
29
30 hydrolysis reaction. After which the beads were separated, washed with CaCl₂ solution 0.1 M and stored at 4 °C until the next
31
32 use. The reaction medium was then replaced with fresh medium. The activity of beads in the first run was defined as 100 %.

33 34 35 **Thermostability of the free and immobilized protease**

36
37 To determine the thermostability, the enzyme free or immobilized was incubated at 45-50 °C in the absence of substrate, and
38
39 residual activity was determined for different periods (10 to 120 min). The assays were carried out at the optima of temperature
40
41 and pH of enzyme.

42 43 44 **Reproducibility of results**

45
46 The curves presented are those which best fit the experimental data. All the results are the mean of at least three independent
47
48 experiments and represent the mean ±SD.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Results

Optimization of culture conditions for protease production

Protease production by *Aspergillus flavus* was investigated using several culture medium, carbon and nitrogen sources, intervals of cultivation and pH, and use (or not) of agitation. All these conditions may affect the enzyme synthesis and production by filamentous fungi. The fungi produced protease in large amounts under agitation (100 rpm), within 72-96 h of incubation. The influence of different carbon sources, including different lignocellulosic materials, on the production of protease was investigated (data not shown). The best carbon sources to the protease production were rice bran (78.3 U/mg) followed by wheat bran and soybean meal (58.0 U/mg). Growth on 1% corncob and 1% chicken feather resulted in a lower production. The results indicated that different carbon sources have a different impact on the production of enzyme. The production of protease was further monitored at various concentrations of rice bran, with maximal protease production was achieved with 0.75% rice bran (145.0 U/mg). Further increases in rice bran concentration led to the decrease of the enzyme production.

The influence of various nitrogen sources protease production was evaluated using the production medium containing 0.75 % rice bran as the sole carbon source (data not shown). High yields of protease production were observed with ammonium sulfate (160.0 U/mg followed by NaNO₃ (150.0U/mg) at final concentration of 0.75 %. On the other hand, others organic and inorganic nitrogen sources proved to be unfavorable, where enzyme production yield drastically reduced of the maximum output level, in case of peptone, urea, egg albumin, yeast extract and meat extract, respectively. The production of protease by *A. flavus* was further monitored at various concentrations of ammonium sulfate (0.1-1.0%). The maximal enzyme yield was obtained at concentrations of 0.75 % (data not show). However, further increase of yeast extract led to a significant decrease in the enzyme production.

The initial pH of the media influences fungal growth and enzyme secretion. The fungi was incubated in medium of different initial pH values (5.0 to 8.5) and incubated for 96 h. The peak protease production was obtained with pH value of 6.5 (182.0 U/mg), and the enzyme production decreased drastically using higher pH values on medium cultivation.

Protease purification from *A. flavus*

An extracellular protease was purified directly from the supernatant obtained from *A. flavus* culture. The elution profiles of enzyme in Sephacryl S-200 and CM-cellulose chromatography are shown in Figure 1, and the Table 1 summarizes typical

1
2
3
4 results of a purification protocol. After the last chromatographic step, the specific activity of the purified enzyme was 3285.0
5 U/mg. The enzyme was purified 35-fold, with a yield of about 12 %. The purified enzyme appeared as a single protein band
6 (10 % SDS-PAGE) with a molecular mass approximately corresponding to 32 kDa (Figure 2). The zymogram profile and the
7 silver nitrate stain of purified enzyme applied on non-denaturing gel electrophoresis (7 % PAGE) also showed a single protein
8 band (data not shown).
9
10
11
12

13 14 15 16 17 **Biochemical properties and immobilization of purified protease**

18
19
20 Some biochemical properties of the purified extracellular protease from *A. flavus* were studied. Enzyme found more
21 active at acidic pH in the range of 6.0-7.0, but was optimally active at pH 6.5 (Figure 3a). At temperatures range 45-55 °C the
22 enzyme activity increased steadily, achieving its maximum at 55 °C. The activity rapidly decreased at higher temperatures, and
23 at 65 °C the detected activity dropped to only 30 % of the maximal value (Figure 3b).
24
25
26

27
28 The effect of various metal ions (Ca^{2+} , Co^{2+} , Al^{3+} , K^{+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} and Zn^{2+}) on the protease activity was
29 determined (data not show). The enzyme was drastically inhibited by Hg^{2+} and Ag^{2+} and Cu^{2+} . The addition of Mg^{2+} , Ca^{2+} ,
30 Zn^{2+} increased enzyme activity by about 53, 57 and 38 %, respectively. The most of other metals ions, such as Co^{2+} , Al^{3+} and
31 K^{+} tested at 5 mM did not affect enzymatic activity.
32
33
34

35
36 The purified protease was most stable between 1.0 and 5.0 % NaCl concentrations. We report that much higher
37 concentration of NaCl decreasing drastically the activity, and did not significantly enhance efficiency of the protease.
38
39

40
41 The effect of different substances on protease activity are shown in Table 2. The activity of *A. flavus* protease was
42 strongly inhibited by PMSF with a concentration of 10 mM, indicating that the peptidase produced by the fungi is a serine
43 protease. Pepstatin A and EDTA exerted no effect. In contrast, the dithiothreitol (DTT) decreases the enzyme activity at 50 %.
44 The detergents promoted various effects on protease activity. The results revealed that the enzyme activity was highly stable in
45 the presence of Tween 80, CTAB and activated by Triton X-100 (181.0%). However, the enzyme was drastically inhibited by
46 PEG (43%) and SDS (96.5%). The stability of the serine protease purified from *A. flavus* to organic solvents showed that in the
47 presence of acetonitrile, the residual enzyme activity value was 77.2%, followed by methanol (68.0%), butanol (65.1%), and
48 DMSO (62.7%), respectively. Acetone and isopropanol caused inhibition of more than 50% in the enzyme.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 The figure 4a shows the effect of thermo stability on the protease activity. When the free enzyme was incubated in
5 phosphate sodium buffer, pH 6.5, the protease was fairly stable up to 60 min when incubated at 45 °C and 50 °C (full lines),
6 exhibiting a half-life of 20 min at 50°C. Aiming to improvement the protease thermo stability, the enzyme was immobilized on
7 alginate and the procedure showed to be efficient. The immobilized enzyme in alginate was extremely stable at 45 °C until 60
8 min, without loss in protease activity. When the temperature was increased to 50°C, the enzyme was stable until 30 min,
9 presenting a half-life of 44 min. The immobilization promoted a protection to temperature inactivation effects, showing an
10 increase of temperature stability on immobilized enzyme of 8-fold higher than free-enzyme at 50°C (data not shown).
11
12
13
14
15
16
17

18 Figure 4b shows the effect of repeated use on the activity of the immobilized protease for 10 cycles with casein as the
19 substrate. The immobilized protease was stable the enzymatic activity after ten repeated cycles of reuse, maintaining around
20 80% of enzyme activity during these consecutive cycles. Immobilized protease retained its activity for longer time and can be
21 reused up to ten cycles. As shown in Fig. 5 hair from cow skin could be easily removed after 24 h of incubation with the
22 protease compared with the control (skin treated with buffer).
23
24
25
26
27
28
29
30

31 Discussion

32
33 The synthesis and production of the enzymes by filamentous fungi in great amounts required to biotechnological
34 applications can be substantially affected by physical and chemical factors as culture medium type, carbon and nitrogen
35 sources, interval time of cultivation and initial pH medium, and use (or not) of agitation of culture medium, presence of metal
36 ions and others (Souza et al. 2015). Under submerged state fermentation, using different agricultural residues as rice bran and
37 wheat bran and soybean meal, the fungus *A. flavus* produced high quantities of protease (present study). In literature, the
38 enzyme production using different agro industrial residues as carbon sources, has been reported for *Aspergillus* species
39 (Guimarães et al. 2013), and the possibility of using agricultural residues to produce enzymes may reduce the production costs
40 resulting in a cheaper product (Gupta et al. 2002; Souza et al. 2015). To inducers of enzyme production as different nitrogen
41 sources, the high yields of protease production (about 2-fold) was observed using ammonium sulfate and sodium nitrate
42 (0.75%, w/v) to *A. flavus*. There are some reports on the repressive role of organic nitrogen sources and excessive amino acid
43 and ammonium ions in protease production (Zanoelo et al. 2013). The acidic initial pH (6.5) induced the production of
44 protease by *A. flavus*. To *Aspergillus fumigatus* (Silva et al. 2013) and *Aspergillus oryzae* (Sandhya et al. 2005), maximum
45 amounts of protease were produced at pH 7.0 and 7.0-9.0, respectively. It is clear that the maximal production of proteases by
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 the fungi is highly susceptible to the carbon and nitrogen sources, and other physical-chemical parameters as the initial pH and
5 agitation of cultivation media to maximize the enzyme production (Zanoelo et al. 2013). In this study, an extracellular protease
6 was purified in two steps using Sephacryl S-200 and CM-cellulose chromatographies. SDS-PAGE analysis revealed a
7
8 molecular mass of 32 kDa . Similar results to other proteases were presented by Anitha and Palanivelu (2013). The molecular
9
10 mass of several proteases from *Aspergillus* have been reported in the range of 25- 45kDa (Gupta et al. 2002). Some
11
12 biochemical properties of the purified extracellular protease from *A. flavus* were studied. At temperatures range 45-55 °C the
13
14 enzyme activity increased steadily, achieving its maximum at 55 °C. Yadav et al (2015) reported a protease from *A. flavus* with
15
16 maximum activity at 40 °C. This optimal temperature value was comparable to that observed for protease *Aspergillus* genera,
17
18 ranging from 35 to 65 °C (Hernández-Martinez et al. 2011; Shirasaka et al. 2012; Anitha and Palanivelu, 2013). Most fungal
19
20 protease exhibit temperature optima ranging from 40 to 50 °C (Rao et al. 1998; Wang et al. 2005). The addition of Mg²⁺, Ca²⁺,
21
22 Zn²⁺ increased enzyme activity by about 53, 57 and 38%, respectively. The increased in the activity by Ca²⁺ is common in
23
24 serine-proteases and it was related in *A. clavatus* ES1 (Hajji et al. 2007).
25
26

27 The enzyme was more stable at 1.0 and 5% NaCl concentration. The high salt-tolerance is an important propriety for
28
29 futures biotechnological applications that require high osmotic pressures (Sathishkumar et al. 2015). In this study, the protease
30
31 was strongly inhibited by PMSF with a concentration of 10 mM, indicating that the peptidase produced by the fungi is a serine
32
33 protease. Pepstatin A and EDTA exerted no effect, suggesting that it is neither an aspartic protease nor a metalloprotease. The
34
35 inhibition of serine protease by PMSF is due the sulphonation the serine residue on the active site of the enzyme, resulting in a
36
37 decrease protease activity (Kumar, 2002). On the other hand, the reducing agents tested as β-mercaptoethanol, which
38
39 disassociate disulfide bonds, crucial for stabilizing the tertiary structure of proteins, did not affect the protease activity.
40
41 Possibly, the reduction of large number of the disulfide bonds makes it easier the enzyme to act (Anitha & Palanivelu 2013). In
42
43 contrast, the dithiothreitol (DTT) decreases the enzyme activity at 50%. The detergents promoted various effects on protease
44
45 activity. The results revealed that the enzyme activity was highly stable in the presence of Tween 80, CTAB and activated by
46
47 Triton X-100. However, the enzyme was drastically inhibited by PEG and SDS. Similarly, the total inactivation by the SDS
48
49 was also reported for serine proteases from *Myceliophthora* sp (Zanphorlin et al. 2011), *Aspergillus fumigatus* (Silva et al.
50
51 2013) *Aspergillus clavatus* ES1 (Hajji et al. 2008). The keratinolytic protease from *Aspergillus parasiticus* was also inhibited
52
53 by SDS and CTAB at 0.5% (Anitha and Palanively 2013). The stability of the serine protease purified from *A. flavus* to organic
54
55 solvents showed that in the presence of acetone and isopropanol caused inhibition of more than 50% in the enzyme. The
56
57 addition of acetone or butanol drastically inhibited the serine protease found to *Myceliophthora* sp (Zanphorlin et al 2011). The
58
59 immobilized enzyme in alginate was extremely stable at 45 °C until 60 min, without loss in protease activity. The
60

10

1
2
3
4 immobilization promoted a protection to temperature inactivation effects, showing an increase of temperature stability on
5 immobilized enzyme. The protease immobilization in alginate not only maintained some biochemical properties, as also
6 significantly improved its thermal stability and permitted its reuse for 10 cycles. In another study it was reported that protease
7 entrapped in Ca-alginate beads was reused forth cycle with total lost. of activity (Anwar et al. 2009).
8
9
10

11
12 It demonstrate that the immobilization process protects the protease against heat inactivation, and suggest that
13 enzyme can be used in biotechnological process in high temperature retaining the catalytic efficiency (Benassi et al. 2013;
14 Carvalho et al. 2014). The utilization of immobilized enzyme in industrial process is important mainly for the economic
15 viability, increasing the reusability and the thermostability (Guisan et al. 2006; da Silva et al. 2009; Zanphorlin et al. 2010).
16 Enzymatic dehairing is increasingly considered as an attractive alternative to the chemical method because this non-toxic
17 process is feasible for improving leather quality. The dehairing results indicated that the enzyme has potential applications in
18 the leather industry (Rao et al. 1998, Deng et al. 2016). All results contributes for better understanding biochemical properties
19 of *Aspergillus flavus* protease.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31 **Conclusion**

32
33 In the present study, *Aspergillus flavus* was used for highest protease production using agroindustrial residues as carbon
34 sources. The enzyme was stable at several detergents and oxidants agents, as well as its excellent capacity to removal and
35 leather hairing, making them more suitable for industrial use. The immobilization process in alginate revealed that enzyme can
36 be used during 10 times, with expressive increased of the thermo stability. All results contribute for better understanding
37 biochemical properties of *Aspergillus flavus* protease.
38
39
40
41
42
43
44
45

46 **Acknowledgements**

47
48 The authors thank Michelle Sorgatto for technical assistance.
49

50 **Declaration of interest**

51
52
53 This work was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant.
54 563823/2010-0/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Apoio ao
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect). P.O.S. received a M.Sc.
5 scholarship from CAPES (Grant number 1427083) and E.E.L. received a M.Sc. scholarship from Fundect (Grant number
6 23/200.544/2014).
7
8
9

10 11 12 13 **References**

14
15 Anitha TS and Palanivelu P. 2013. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new
16 isolate of *Aspergillus parasiticus*. Prot Express and Purific 88: 214-220
17

18
19
20 Anwar A, Qader SAU., Raiz A, Iqbal S and Azhar A. 2009. Calcium alginate: a support material for immobilization of
21 proteases from newly isolated strain of *Bacillus subtilis* KIBGE-HAS. World Appl Sci J 10:1281-1286
22

23
24
25 Azzoni AR, Takahaski KK, Woodard SL, Miranda EA, Nikolov ZL. 2005. Purification of recombinant aprotinin produced in
26 transgenic corn seed: separation from CTI utilizing ion-exchange chromatography. Braz J Chem Eng 22:323-330
27

28
29 Benassi VM, Silva TM, Pessela BC, Guisan JM, Mateo C, Lima MS, Jorge JA and Polizeli, MLTM. 2013. Immobilization
30 and biochemical properties of a β -xylosidase activated by glucose/xylose from *Aspergillus niger* USP-67 with
31 transxylosylation activity. J Mol Catalysis B: Enzymatic 89:93-101
32

33
34
35 Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. 2002. Biochemistry. 5th ed. W. H. Freeman, New York
36

37
38
39 Carvalho CC, Ziotti LS, Pereira MG, Cruz AF, Jorge JA. and Polizeli MLTM. 2014. Production and functional properties of
40 free and immobilized glucoamylases of *Penicillium citrinum*. Jacobs J Biotechnol Bioeng 2:1-7
41

42
43
44 Castro RJS, Nishide TG and Sato HH. 2014. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger*
45 under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. Biocatal Agric Biotechnol 4: 236-245
46

47
48
49 Deng A, Wu J, Zhang Y, Zhang G and Wen T. 2010. Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline
50 protease from *Bacillus* sp. B001. Bioresource Technol 101:7100-7106
51

52
53
54 Ghareib M, Fawzi EM and Aldossary NA. 2014. Thermostable alkaline protease from *Thermomyces lanuginosus*:
55 optimization, purification and characterization. Ann Microbiol 64:859-867
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 Guimarães NCA, Sorgatto M, Peixoto-Nogueira S.C, Betini JHA, Zanoelo FF, Marques MR, Polizeli MLTM and Giannesi
5
6 G.C. 2013. Xylanase Production from *Aspergillus japonicus* var. *aculeatus*: Production using agroindustrial residues and
7
8 biobleaching effect on pulp. J Proteomics Enzymol 2:1-6
9
10 Guisan JM. 2006. Immobilization of enzymes and cells, 2nd Ed., Humana Press Totowa, NJ.
11
12
13 Gupta R, Beg QK and Lorenz P. 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl
14
15 Microbiol Biotechnol 59:15-32
16
17
18 Hajji M, Rebai A, Gharsallah N. and Nasri M. 2008. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1
19
20 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. Appl Microbiol Biotechnol 79:915-923
21
22
23 Hernández-Martínez R, Gutiérrez-Sánchez G, Bergmann CW, Loera-Corral O, Rojo-Domínguez A, Huerta-Ochoa S,
24
25 Regalado-González C and Prado-Barragán LA. 2011. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine
26
27 protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochem 46:2001-2006
28
29
30 Huang Q, Peng Y, Li X, Wang H and Zhang Y. 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Alkaline Serine
31
32 Protease with Dehairing Function from *Bacillus pumilus*. Curr Microbiol 46:169-173
33
34
35 Kumar CG. 2002. Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*.
36
37 Lett App Microbiol 34:13-17
38
39
40 Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685
41
42
43
44 Lowry H, Rosebrough NJ, Farr AL and Randal RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem.
45
46 193:265-275
47
48
49 Pant G, Prakash A, Pavani JVP, Bera S, Deviram GVNS, Kumar A, Panchpuri M. and Prasuna RG. 2015. Production,
50
51 optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. J Taibah Univ Sci, 9:50-55
52
53
54 Paul T, Jana A, Mandal AK, Mandal A, Das Mohapatra PK, Mondal KC. 2013. Bacterial keratinolytic protease, imminent
55
56 starter for NextGen leather and detergent industries. Sustainable Chemistry and Pharmacy 3: 8–22.
57
58
59
60 Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS. and Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial
61
62 proteases. Microbiol Mol Biol R 62: 597-635

1
2
3
4 Sandhya C, Sumantha A, Szakacs G and Pandey A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by
5 *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem 40:2689-2694
6
7

8
9 Sarath G, Zeece MG. and Penheiter AR. 2001. In Protease assay methods. Proteolytic enzymes: a practical approach,
10 (Beynon, R. and Bond J.S. ed.), Oxford University Press, New York, NY pp. 45-76.
11
12

13 Sathishkumar R, Ananthan G and Arun J. 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian
14 associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. Biocatal Agricul Biotechnol 4: 214-220
15
16

17 Shirasaka N, Naitou M, Okamura K, Kusuda M, Fukuta Y and Terashita T. 2012. Purification and characterization of a
18 fibrinolytic protease from *Aspergillus oryzae* KSK-3. Mycoscience 53:354-364
19
20

21
22 Silva RR, Cabral TPF, Rodrigues A and Cabral H. 2013. Production and partial characterization of serine and metallo
23 peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. Brazilian J Microbiol 44:
24 235-242
25
26

27
28 Silva VCF, Contesini FJ and Carvalho PO. 2009. Enantioselective behavior of lipases from *Aspergillus niger* immobilized in
29 different supports. J Ind Microbiol Biotechnol 36:949-945
30
31

32
33 Souza PM, Bittencourt MA, Caprara CC, Freitas MRPC, Silveira D, Fonseca YM, Ferreira Filho EX, Pessoa Junior A and
34 Magalhães PO. 2015. A biotechnology perspective of fungal proteases. Braz J Microbiol, 46:337-346
35
36

37 Vijayaraghavan P, Lazarus S and Vincent SGP. 2014. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT
38 under solid-state fermentation using cow dung: Biosynthesis and properties. Saudi J Biol Sci 21:27-34
39
40

41
42 Vojcic L, Pitzler C, Körfer G, Jakob F, Martinez R, Maurer KH and Schwaneberg U. 2015. Advances in protease engineering
43 for laundry detergents. New Biotech 32:629-34
44
45

46 Waghmare SR, Gurav AA, Mali AS, Nadaf NH, Jadhav D B and Sonawane KD. 2015. Purification and characterization of
47 novel organic solvent tolerant 98kDa alkaline protease from isolated *Stenotrophomonas maltophilia* strain SK. Protein Expres
48 Purific 107:1-6
49
50

51
52 Wang SL, Chen YH, Wang CL, Yen YH and Chern M.K. 2005. Purification and characterization of a serine peptidase
53 extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. Enzyme Microb Tech 36: 660-
54 665
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4 Wanil AH, Sharma M, Salwan R, Singh G, Chahota R, Verma S. 2016. Cloning, Expression, and Functional Characterization
5 of Serine Protease Aprv2 from Virulent Isolate *Dichelobacter nodosus* of Indian Origin. *Appl Biochem Biotechnol* 179:1-12
6
7 Yadav S.K., Bisht D., Tiwari S. and Darmwal N.S. 2015. Purification, biochemical characterization and performance
8 evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. *Biocatal Agricul Biotechnol* 4:667-677
9
10
11
12 Zambare V, Nilegaonkar S. and Kanekar P. 2011. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327:
13 enzyme production and its partial characterization. *N Biotechnol.* 28:173-181
14
15
16
17 Zanoelo, FF, Giannesi, GC and Cabral H. 2013. In *Proteolytic enzymes: Biochemical properties, production and*
18 *biotechnological application*, Fungal Enzymes (Polizeli, M.L.T.M. and Rai M., Ed.), CRC Press Boca Raton, FL, pp. 94-112.
19
20
21 Zaphorlin LM, Cabral H, Arantes E, Assis D, Juliano L, Juliano MA, da-Silva R, Gomes E and Bonilla-Rodriguez GO. 2011.
22 Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process*
23 *Biochem* 46: 2137-2143
24
25
26
27
28 Zaphorlin LM, Facchini FDA, Vasconcelos F, Bonugli-Santos RC, Rodrigues A, Sette LD, Gomes E and Bonilla-Rodriguez
29 G.O. 2010. Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new
30 thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *J Microbiol* 48:331-336
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Sephacryl S 200 (a) and CM-celullose (b) chromatographic profiles of *Aspergillus flavus* protease activity (filled circle), absorbance at 280 nm (open circle). Other details given in “Materials and methods”

Figure 2. Electrophoretic profile (10% SDS-PAGE) of purified extracellular protease from *A. flavus*.

Figure 3: Effect of pH and temperature on protease activity (A): Effect of temperature on protease activity. The reaction mixture containing purified enzyme was incubated at different temperatures (30- 65°C) pH 6.5 and the activity was determined. (B): The enzyme was incubated in citrate-phosphate buffer in different pHs (3.5-7.0) at 30°C and the activity was measured according to the standard enzyme assay.

Figure 4: Thermal inactivation of purified free and immobilized protease (A) and Repeated use of immobilized protease (B). Free Protease 45°C (---■---), Immobilized protease 45°C(---■---), Free Protease 50°C (---●---), Immobilized protease 50°C (---●---)

Figure 5: Deharing activity of the serine protease of *Aspergillus flavus*. (A) Control (without protease) (B) 100 U of protease (B) 300 U of protease (C) 900 U of protease.

1
2
3
4 TABLES
5
6

7 **Table 1.** Purification of the extracellular protease from *A. flavus*.
8

9 **Table 2:** Effect of various substances on the purified protease activity.
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only

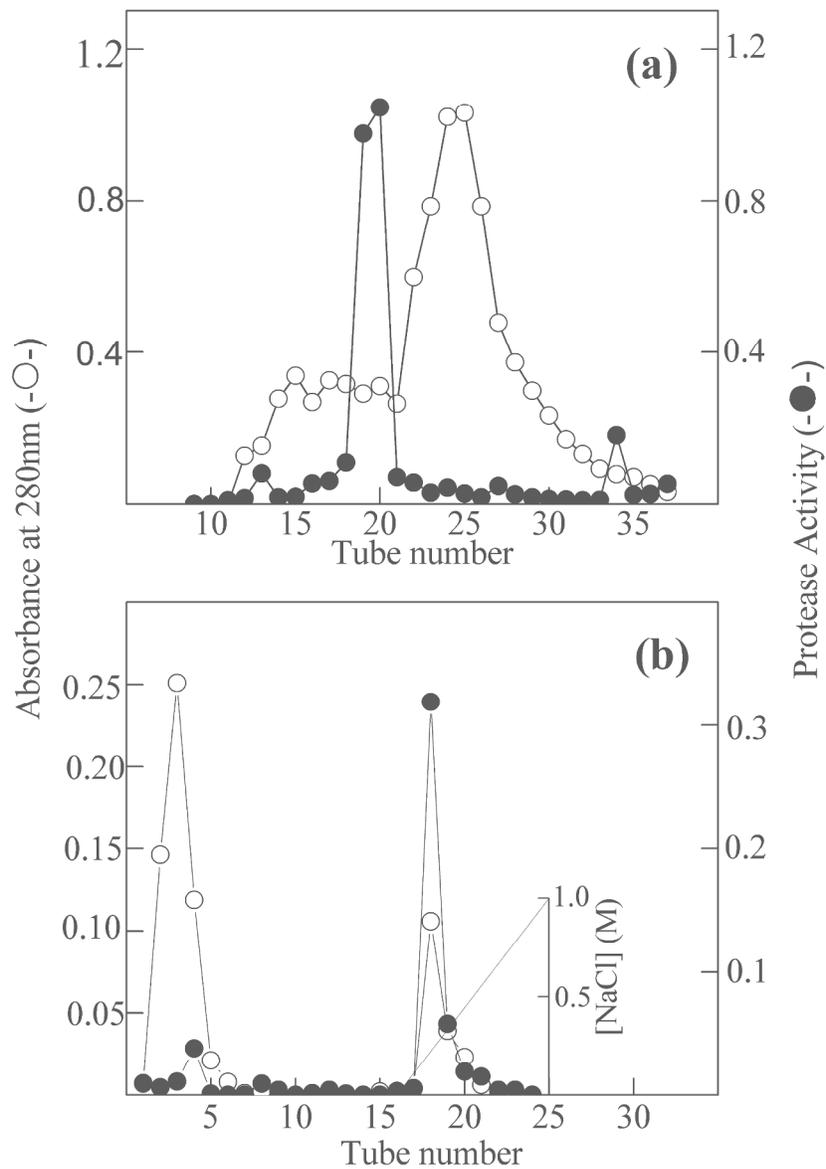


Figure 1. Sephacryl S 200 (a) and CM-celullose (b) chromatographic profiles of *Aspergillus flavus* protease activity (filled circle), absorbance at 280 nm (open circle). Other details given in "Materials and methods"

144x204mm (600 x 600 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

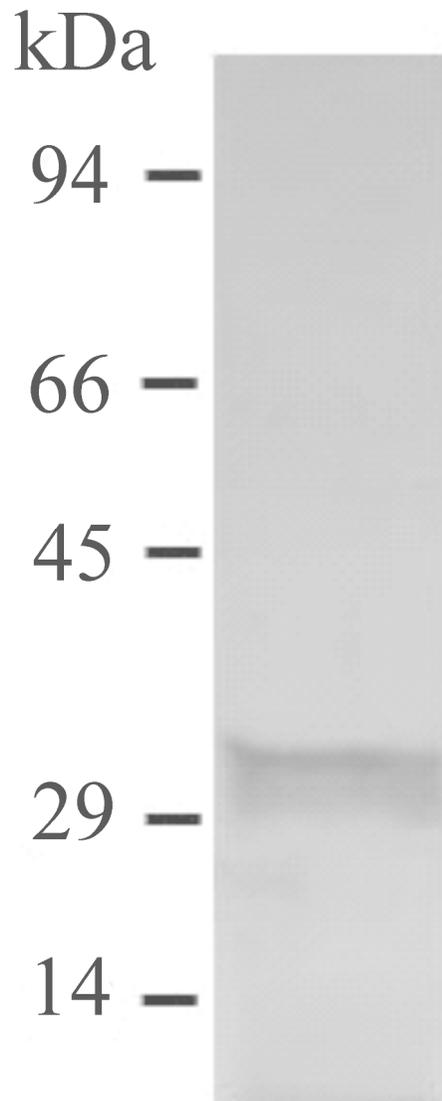


Figure 2. Electrophoretic profile (10% SDS-PAGE) of purified extracellular protease from *A. flavus*.

93x237mm (300 x 300 DPI)

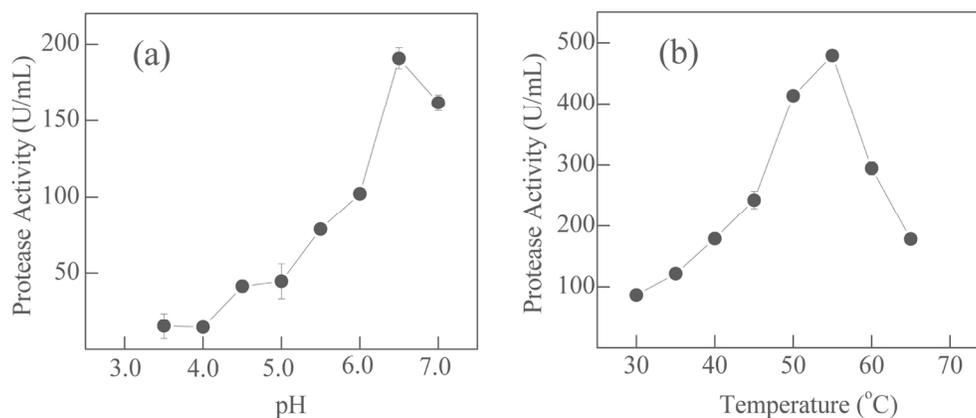


Figure 3: Effect of pH and temperature on protease activity (A): Effect of temperature on protease activity. The reaction mixture containing purified enzyme was incubated at different temperatures (30- 65°C) pH 6.5 and the activity was determined. (B): The enzyme was incubated in citrate-phosphate buffer in different pHs (3.5-7.0) at 30°C and the activity was measured according to the standard enzyme assay.

72x30mm (600 x 600 DPI)

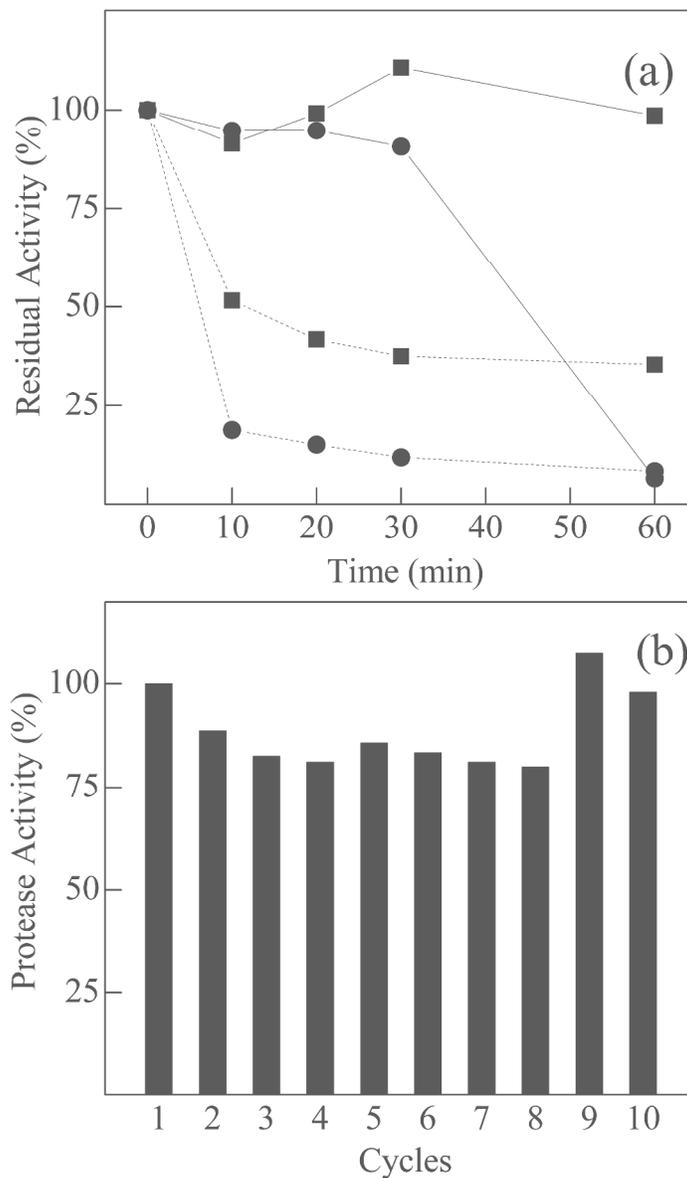
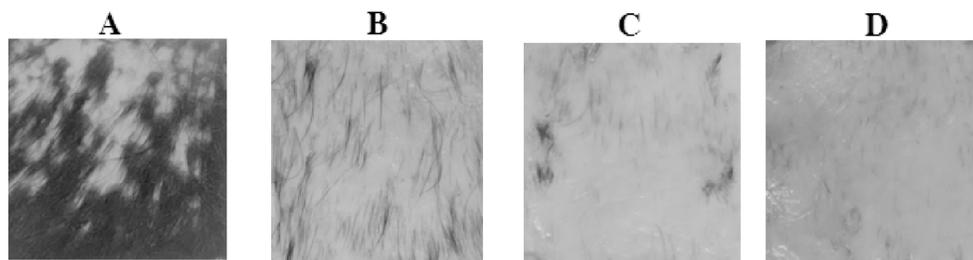


Figure 4: Thermal inactivation of purified free and immobilized protease (A) and Repeated use of immobilized protease (B). Free Protease 45°C (---■---), Immobilized protease 45°C(—■—), Free Protease 50°C (---●---), Immobilized protease 50°C (—●—)

164x271mm (600 x 600 DPI)



17 Figure 5: Deharing activity of the serine protease of *Aspergillus flavus*. (A) Control (without protease) (B)
18 100 U of protease (C) 300 U of protease (D) 900 U of protease.

19 161x43mm (300 x 300 DPI)

20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Peer Review Only

1 **Table 1.** Purification of the extracellular protease from *A. flavus*.

Step purification	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude extract	40.0	11128	278.0	100.0	1.0
Sephacryl S-200	5.7	9730	1701.0	87.0	6.1
CM-Cellulose	1.2	3942	3285.0	35.0	12.0

Table 2: Effect of various substances on the purified protease activity.

Substances				Residual Activity
Organic solvents	Detergents	Inhibitors	Reducing agents	(%)
Control*	Control	Control	Control	100.0
Acetonitrile	-	-	-	77.2
Butanol	-	-	-	65.1
Acetone	-	-	-	30.3
Isopropanol	-	-	-	51.7
Methanol	-	-	-	68.0
DMSO	-	-	-	62.7
-	Tween 80	-	-	116.6
-	Triton X-100	-	-	281.2
-	Polyethylene glycol	-	-	57.0
-	SDS	-	-	3.5
-	CTAB	-	-	99.0
-	-	PMSF	-	2.1
-	-	EDTA	-	70.1
-	-	Pepstatin A	-	60.5
-	-	-	β -Mercaptoethanol	99.8
-	-	-	DTT	50.0