

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE CASTANHA (*BERTHOLLETIA EXCELSA*) E
ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS* AUBL.) COMO FONTE DE
CARBONO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES COM APLICAÇÃO
COMESTOLÓGICA.

Bolsista: Viviane Brito Nogueira, CNPq

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB – B – 0017/2010
UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS DE CASTANHA (*BERTHOLLETIA EXCELSA*) E
ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS* AUBL.) COMO FONTE DE
CARBONO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES COM APLICAÇÃO
COMESTOLÓGICA.

Bolsista: Viviane Brito Nogueira, CNPq
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leonor Alves de Oliveira da Silva

MANAUS
2011

Resumo

O presente estudo visou utilizar resíduos e óleo obtidos na manufatura dos referidos vegetais amazônicos, como fonte de carbono em fermentações semi-sólidas e líquidas, para a produção de enzimas proteolíticas, junto a sua caracterização enzimática com possibilidades para a aplicação industrial.

Para a produção do complexo de enzimas proteolíticas em fermentação líquida, 10^7 esporos/mL do fungo filamentoso – F7, foram inoculados em 25mL do meio líquido de Vogel (1956) contendo 2% da fonte de carbono (resíduo de Castanha-do-brasil e óleo de andiroba), em fermentações em condições estacionária e sob agitação de 150 rpm (*shaker*) a 28°C, por 168 horas. Na fermentação semi-sólida, o referido fungo foi inoculado em 2,5g do resíduo de Castanha-do-brasil. As atividades proteolíticas e quantificação de proteína (método Bradford) foram analisadas quantitativamente a cada 24h por um período de 7 dias. Após a determinação do pico de produção da enzima de interesse, foram realizadas fermentações líquidas em procedimentos semelhantes aos citados anteriormente variando apenas os pHs, sendo estes estudados em valores de 7 a 9,5. Posteriormente definido o pH de produção, as fermentações foram realizadas em diferentes temperaturas (22°C, 36°C e 40°C). Para o ensaio de proteases, foi utilizado caseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH7,4, segundo Leighthon et al, 1973, onde uma unidade de atividade proteolítica é definida como a quantidade de enzima que produz diferença de absorbância de 0,01 no comprimento de onda de 280 nm durante 1h de incubação em temperatura ambiente por mililitro da solução do complexo enzimático. Foram estudados parâmetros durante a dosagem da atividade enzimática, referentes a caracterização parcial do complexo proteolítico excretado pelo referido micro-organismo, sendo estes, o efeito do pH, estabilidade em diferentes pHs, temperatura ótima, a estabilidade em diferentes temperaturas, o efeito da interferência de íons e inibidores (PMSF, DTT, EDTA, Leupeptina, $MgCl_2$, $MnSO_4$). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foi realizada eletroforese SDS-PAGE para estabelecer o perfil protéico do complexo enzimático.

Foi determinado que as dosagens enzimáticas fossem realizadas utilizando caseína como substrato. Após a realização do presente estudo foi possível detectar que dentre as duas fontes de carbono estudadas, em fermentações líquidas estacionárias, detectou-se picos de produção de $7,129 \pm 0,4$ U/mL e 1,453 U/mg de proteína com 144h de cultivo, utilizando castanha-do-brasil, e picos de $1,133 \pm 0,1$ U/mL e 1,630 U/mg de proteína com 72h de cultivo, utilizando óleo de andiroba. Nas fermentações líquidas sob agitação, detectou-se pico de produção de $6,920 \pm 0,4$ U/mL e 1,115 U/mg de proteína com 72h de cultivo. O pH 9,0 foi observado como ótimo de produção com atividade de $2,518 \pm 0,4$ U/mL. A fermentação em estado sólido, no entanto, mostrou-se o melhor processo fermentativo, visto que seu pico de produção foi $17,018 \pm 0,7$ U/mL e 2,048 U/mg de proteína com 72h de cultivo. A temperatura ótima de produção, em fermentação líquida no estado estacionário foi a 22°C, obtendo-se atividade de $6,990 \pm 0,3$ U/mL e 11,493 U/mg de proteína com 144h de cultivo. Enquanto que a fermentação sólida, foi a temperatura de 40°C, com atividade de $13,111 \pm 0,3$ U/mL e 18,989 U/mg de proteína com 72h de cultivo. Na caracterização durante a atividade enzimática, a melhor temperatura para dosagem foi de 36°C ($8,82 \pm 0,3$ U/mL), mantendo-se a atividade da mesma em 100% quando a reação foi realizada durante diferentes tempos, os quais foram citados anteriormente. O melhor resultado obtido durante a dosagem foi em pH 8,0 ($32,45 \pm 0,7$ U/mL), mantendo 87,5% da atividade quando submetido as condições citadas anteriormente. Quando adicionado PMSF, 98,9% da atividade proteolítica foi mantida, assim como 100% em DTT, 97,9% em EDTA, 100% em Leupeptina, 98,3% em $MgCl_2$, 98,2% em $ZnCl_2$ e 100% em $MnSO_4$. A atividade específica foi de 64,303 U/mg de proteína, depois de estabelecidos os parâmetros citados anteriormente. O perfil protéico analisado eletroforicamente mostrou 3 complexos protéicos bem definidos, de pesos aproximados de: 35KDa, 25KDa e 14KDa, indicando a presença de outras proteínas que podem ter aplicação industrial, além de proteases.

Neste contexto, o fungo filamentoso isolado do solo amazônico designado F7 mostra-se bom produtor de proteases, mesmo em sua forma selvagem, indicando que sua aplicação industrial seria relevante quando combinada a mais estudos.

Abstract

This study aims to use waste and oil obtained in the manufacture of such plants in the Amazon, as a carbon source in semi-solid and liquid fermentations for the production of proteolytic enzymes, together with its characterization for subsequent industrial application.

To produce the complex of proteolytic enzymes in fermentation liquid, 10^7 spores/mL of the filamentous fungus - F7, were inoculated into 25mL of liquid medium of Vogel (1956) containing 2% of carbon source (the Brazil nut and Andiroba oil) in fermentations in stationary conditions and under agitation of 150 rpm (*shaker*) at 28°C for 168-h. In solid state fermentation, this fungus was inoculated into 2,5g of the Brazil nut's residue. The quantification of proteolytic activities and protein (Bradford method) were quantitatively analyzed every 24 hours for a period of 7 days. After determining the peak production of the enzyme, were held in liquid fermentation procedures similar to those mentioned above, varying only the pH, being studied in these values from 7,0 to 9,5. Subsequently the pH set production, fermentations were performed at different temperatures (22°C, 36°C and 40°C). For the assay of proteases, used 1% casein in Tris-HCl pH 7,4, second Leighton et al, 1973, where one unit of proteolytic activity is defined as the amount of enzyme that produces difference in absorbance for 1-h of incubation in ambient temperature of the solution per milliliter of crude extract. Parameters were studied during the dosing of enzyme activity, relative to partial characterization of the proteolytic complex excreted by that micro-organism, the latter being the effect of pH, stability at different pH, temperature optimum, stability at different temperatures, the effect of interference ions and inhibitors (PMSF, DTT, EDTA, Leupeptina, MgCl₂, MnSO₄). All tests were performed in triplicate. Performed SDS-PAGE electrophoresis to establish the protein profile of the enzyme complex.

It was determined that the dosages were performed using casein as substrate. Comparing the two carbon sources in stationary liquid fermentation, was detected peak production of $7,129 \pm 0,4$ U/mL and 1,453 U/mg protein with 144-h of culture, using the Brazil nut, and peaks at $1,133 \pm 0,1$ U/mL and 1,630 U/mg protein with 72-h of cultivation, using Andiroba oil. In agitated liquid fermentation, the peak of production observed was $6,920 \pm 0,4$ U/mL and 1,115 U/mg protein with 72-h of cultivation. The pH 9,0 was observed as a great production with activity of $2,518 \pm 0,4$ U/mL. The solid-state fermentation, however, showed the best fermentation process, since its peak of production was $17,018 \pm 0,7$ U/mL and 2,048 U/g protein with 72-h of cultivation. The optimum temperature for production in liquid fermentation at steady state was at 22°C, resulting in activity of $6,990 \pm 0,3$ U/mL and 11,493 U/mg protein with 144-h of culture. While the solid fermentation, the temperature was 40°C, with activity of $13,111 \pm 0,3$ U/mL and 18,989 U/mg protein with 72-h of cultivation. In characterizing enzyme activity during the dosage was best temperature to 36°C ($8,82 \pm 0,3$ U/mL), maintaining the same activity of 100% when the reaction was carried out during different times, which were mentioned above. The best result obtained during dosing was at pH 8.0 ($32,45 \pm 0,7$ U/mL), while 87.5% of the activity when subjected to conditions mentioned above. When added PMSF, 98.9% of the proteolytic activity was maintained, as well as 100% in DTT, 97.9% in EDTA, Leupeptina 100%, 98.3% in MgCl₂, ZnCl₂ and 98.2% in 100% MnSO₄. The specific activity was 64.303 U/mg protein, having established the parameters mentioned above. The protein profile of electrophoretic analysis showed three well-defined protein complexes, approximate weight: 35kDa, 25kDa and 14kDa, indicating the presence of other proteins that may have industrial application, and proteases.

In this context, the filamentous fungus isolated from Amazonian soil is designated F7 shows good producer of proteases, even in its wild form, and that indicate that its industrial application would be relevant when combined with further studies.

*Pouco conhecimento faz que as criaturas se sintam
orgulhosas.
Muito conhecimento, que se sintam humildes.
É assim que as espigas sem grãos erguem
desdenhosamente a cabeça para o céu, enquanto que
as cheias a baixam para a terra, sua mãe.*

Leonardo da Vinci

Sumário

1.INTRODUÇÃO.....	8
2.FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
2.1.ENZIMAS.....	9
2.1.1.DEFINIÇÃO DE ENZIMA.....	9
2.1.2.DENOMINAÇÃO DAS ENZIMAS.....	9
2.1.3.CARACTERÍSTICA DAS ENZIMAS.....	9
2.2.ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	10
2.3.ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	10
2.4.TIPOS DE FERMENTAÇÃO.....	11
2.4.1.CULTIVO NO ESTADO LÍQUIDO (Cultivo Submerso).....	12
2.4.2.CULTIVO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES).....	12
2.5.FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	12
2.5.1.FONTE DE CARBONO.....	12
2.5.2.PH.....	13
2.5.3.TEMPERATURA.....	13
2.6.MICROORGANISMO EMPREGADO.....	13
2.7.MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS.....	13
2.8.ÓLEO DE ANDIROBA (<i>CARAPA GUIANENSIS</i> AUBL.).....	14
2.9.CASTANHA-DO-BRASIL (<i>BERTHOLLETIA EXCELSA</i>).....	14
2.10.APLICAÇÕES DAS ENZIMAS NA COSMETOLOGIA.....	14
3.DESCRICÃO METODOLÓGICA.....	16
3.1.PRODUÇÃO DE PROTEASES.....	16
3.1.1.SELEÇÃO DO MICROORGANISMO.....	16
3.1.2.MEIOS DE CULTURA.....	17
3.1.3.REPIQUE DO FUNGO.....	17
3.1.4.PREPARO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS.....	17
3.1.5.CONTAGEM DA SOLUÇÃO DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	18
3.1.5.1.PROCEDIMENTO DE CONTAGEM.....	18
3.2.SELEÇÃO DO MELHOR MÉTODO DE FERMENTAÇÃO.....	18
3.2.1.FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES).....	18
3.2.2.FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO OU SUBMERSA (FSM).....	19
3.3.DETERMINAÇÃO DO PH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.....	19
3.4.DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH E ESTABILIDADE DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	19
3.5.DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	20
3.6.DETERMINAÇÃO DO K_M E $V_{MÁX}$ NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	20
3.7.DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS PROTEASES.....	20
3.8.DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE.....	20
3.9.DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DAS PROTEASES.....	20
3.10.DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS.....	20
3.11.TRATAMENTO DE DADOS.....	20
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1.CINÉTICA ENZIMÁTICA.....	21
4.1.1.DETERMINAÇÃO DO MELHOR SUBSTRATO PARA PROTEASES.....	21
4.1.2.SELEÇÃO DA MELHOR FONTE DE CARBONO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES.....	22
4.1.3.SELEÇÃO DO MELHOR MODO DE FERMENTAÇÃO.....	24

4.2.OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.....	26
4.2.1.TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.....	26
4.2.2.PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO.....	26
4.3.EFEITOS DE PARÂMETROS NA DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	27
4.3.1.EFEITO DA TEMPERATURA.....	28
4.3.2.ESTABILIDADE TÉRMICA.....	28
4.3.3.EFEITO DO PH.....	29
4.3.4.ESTABILIDADE DE PH.....	30
4.3.5.Km E $V_{\text{máx}}$	31
4.3.6.EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	32
4.3.7.PERFIL PROTEICO POR TÉCNICA DE ELETROFORESE.....	33
5.CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	35
6.CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	36
7. REFERÊNCIAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro da tecnologia enzimática movimentou, de acordo com avaliação no ano de 2005, cerca de 147,2 milhões de dólares, correspondendo a 3,7% do mercado internacional (BON, 2008). Tal montante justifica-se pelo interesse gerado por processos que envolvem tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utiliza matérias primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria.

Os microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à diversidade bioquímica, crescimento rápido, com requerimento limitado de espaço, o que diminui o custo de produção em relação às enzimas de origem animal ou vegetal e produção independente de variações sazonais e localização geográfica. Segundo Godfrey e West (1996) e Felix et al (2004), após a descoberta de enzimas de origem microbianas, foram desenvolvidas técnicas para a produção em escala industrial, hoje 90% das enzimas aplicadas industrialmente é de origem microbiana. O mercado mundial de enzimas industriais, conforme Pandey et al (2005), é tão movimentado devido ao fato de que as enzimas microbianas apresentam atividade catalítica em geral muito maior do que os catalisadores sintéticos ou orgânicos (NELSON & COX, 2007). As enzimas possuem alta especificidade por seus substratos, podem atuar sobre condições suaves de temperatura, pH e pressão, resultando em significativa conservação de recursos naturais, utilizam substratos baratos, como resíduos agrícolas e agroindustriais, há possibilidade de se aumentar o rendimento pela otimização das condições de cultivo e pela facilidade de manipulação genética das linhagens, através de evolução dirigida, engenharia de proteínas ou tecnologia do DNA recombinante. Exigem poucos equipamentos e pouca energia, sem gerar produtos indesejáveis, beneficiando a indústria e o meio ambiente, pois não poluem os lençóis freáticos nem são carcinogênicas. (SAID & PIETRO, 2004; GODFREY & WEST, 1996; RAO et al., 1998; SCHIMID et al., 2001; KIRK et al., 2002). Alguns microrganismos produzem baixa quantidade de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimização, possibilitam um aumento significativo do rendimento enzimático (KUMAR, 1999).

Andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) e Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*), representam vegetais com grandes potenciais econômicos, utilizadas em grandes escalas pela população Amazônica de diferentes formas, gerando resíduos ricos em sua composição, bastante complexos e ricos em componentes químicos, que podem ser utilizados de várias maneiras, inclusive como substratos para a produção de enzimas. Nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização desses resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. O acúmulo destes resíduos gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa. (PANDEY et al., 2000). Dentre estas enzimas, temos as proteases, que exerce atividade queratolítica, removendo as células mortas da epiderme e restaurando a barreira natural da pele.

A biodiversidade da Amazônia constitui uma fonte de valor altíssimo para inovação de tecnologias, sendo importantes estudos de microrganismos que produzam eficientemente sistemas enzimáticos de interesse, a seleção de condições ótimas de produção, os quais são fundamentais para o desenvolvimento de processos biocatalíticos mais economicamente competitivos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar a produção do complexo enzimático proteolítico excretado por um fungo filamentosos Amazônicos pertencente da biblioteca microbiana do laboratório de Fermentação e Bioativos do CAM - UFAM, com potencial biotecnológico para uso cosmetológico, em fermentações líquidas e semi-sólidas, utilizando substratos diferentes: óleo de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) e resíduos de Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) e otimização das condições de cultura em relação ao pH e temperatura ótimos de produção dos complexos enzimáticos, assim como a caracterização parcial do extrato bruto na atividade enzimática.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 ENZIMAS

2.1.1 DEFINIÇÃO DE ENZIMA

Enzimas são proteínas altamente especializadas e que exercem a função de catalisadores das reações nos sistemas biológicos. Apresentam uma eficiência catalítica extraordinária, em geral, muito maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos. Elas têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram as reações químicas de maneira formidável e funcionam em soluções aquosas sob condições suaves de pH e temperatura (NELSON & COX, 2011). Conforme Leadlay (1993), as enzimas são de especial importância em fermentações industriais, uma vez que todos os processos de fermentação resultam da atividade enzimática de microrganismos. Com sua ação, regulam a velocidade de muitas reações químicas presentes neste processo. No ano de 2004, conheciam-se cerca de 4.300 enzimas (seqüenciadas), 300 destas comercializadas (FERRER, 2004).

2.1.2 DENOMINAÇÃO DAS ENZIMAS

A denominação *enzima*, proposto em 1867 pelo fisiologista alemão Wilhelm Kühne, deriva da expressão grega *en zymē*, que significa “em fermentação”. Os nomes sistemáticos incluem o substrato, a reação catalisada e a terminação ase (HARTMEIER, 1988). Apesar do esforço de sistematização, permanecem em uso, por razões históricas e comerciais, os nomes triviais, que conforme recomendação de IUB, de 1984, podem ser empregados em conjunto com o código da enzima (EC number). Este código é constituído de quatro algarismos. O primeiro refere-se à classe da enzima (de 1 a 6), o segundo à subclasse (tipo de ação ou grupo sobre o qual atua), o terceiro à subclasse e o quarto refere-se ao número de ordem da enzima dentro da subclasse considerada. Têm-se para protease (3.4.21.19).

2.1.3 CARACTERÍSTICA DAS ENZIMAS

A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por uma parte protéica, porém, ela pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos. Para apresentar atividade catalítica, algumas enzimas requerem a participação de moléculas menores (co-fatores) de natureza não protéica. Os cofatores podem ser íons (Zn^{2+} e Ca^{2+} etc.) ou moléculas orgânicas (co-enzimas). Exemplos são os dinucleotídeos (NAD, NADP, FAD) e a coenzima A, entre outros (Nelson & COX, 2011).

As enzimas são heteropolímeros formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A denominada estrutura primária dessas macromoléculas corresponde à sequência desses aminoácidos, que é geneticamente determinada. As cadeias polipeptídicas, por sua vez, adotam configurações espaciais determinadas pela própria estrutura primária, bem como pelas interações entre seus aminoácidos constituintes. Assim, as interações entre aminoácidos adjacentes podem levar a arranjos espaciais do tipo α -hélice ou do tipo folha β , que compõem a denominada estrutura secundária. A estrutura terciária das enzimas resulta das interações entre aminoácidos, não sequencialmente próximos, que provocam torções e dobramentos de regiões da macromolécula. A estrutura tridimensional terciária configura o sítio catalítico da enzima, que é determinante para a sua atividade biológica. A estrutura quaternária refere-se à interação entre cadeias polipeptídicas e subunidades distintas e ocorre em algumas enzimas complexas de regulação (VOET e VOET, 1995).

A conformação e a estabilização da estrutura molecular das enzimas é assegurada por ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, pontes de dissulfeto, ligações iônicas e forças de van der Waals. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e a especificidade da enzima, dependem da sua estrutura tridimensional. Condições ambientais, tais como pH, temperatura, força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima, e em decorrência, suas propriedades.

A ação das enzimas é altamente específica. Essa especificidade pode se expressar quanto ao tipo de reação ou de substrato (ILLANES, 1995). Apenas alguns aminoácidos participam da ação catalítica, embora cadeias de aminoácidos situadas próximas ao sítio catalítico tenham importante função de fixação de posicionamento da molécula de substrato. Outras sequências de aminoácidos têm importante papel na estabilização da estrutura tridimensional enzimática (LIMA et al., 2001). A classificação enzimática é feita a partir de seis classes principais (Tabela 1).

Tabela 1 – Classes de enzimas segundo a classificação da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUB) e atividade de catalisam.

Classe	Nome da classe	Atividade que catalisa
EC 1	oxidorreduases	reações de oxi-redução
EC 2	transferases	transferência de grupos funcionais
EC 3	hidrolases	reações de hidrólise
EC 4	liases	adicionam grupos a ligações duplas
EC 5	isomerases	reações de isomerização
EC 6	ligases	ligações acopladas à hidrólise de ATP

Fonte: Lehninger, 1976

Proteases estão incluídas no grupo de hidrolases, participando de hidrólise de proteínas.

2.2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas nas proteínas e fragmentos de proteínas (BARRETT et al, 1995). Elas têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, participando das vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Adicionalmente, muitos microrganismos secretam proteases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos da hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para multiplicação celular.

A especificidade das proteases se relacionam com a posição peptídica ou ao tamanho na cadeia de resíduos de aminoácidos e também com seletividade em relação à sequência de aminoácidos vizinhos a ligação (VOET e VOET, 1995).

2.3 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Segundo Lima (2001), a expressão da atividade de uma enzima é medida através da sua velocidade de reação, determinada em condições experimentais estabelecidas. A figura 1 ilustra o progresso de reações conduzidas com distintos teores iniciais de enzima. A concentração do produto formado aumenta linearmente com o tempo num dado intervalo

(velocidade de reação constante). No entanto, a partir de certo tempo, a velocidade (valor da tangente à curva num dado instante) decresce. Vários fatores podem contribuir para esse decréscimo: diminuição da concentração de substrato, inativação parcial da enzima no decorrer da reação, inibição do produto e deslocamento do equilíbrio se a reação for reversível.

Em geral, a inibição pode ser reversível ou irreversível, no primeiro caso, a atividade enzimática é recuperada por diminuição da concentração do inibidor (diluuição, diálise ou ultra filtração). A inibição irreversível é geralmente provocada por ligação covalente entre as moléculas de inibidor e enzima (BON, 2008).

Para evitar a influência de fatores que contribuem para o decréscimo, costuma-se associar a atividade enzimática à medida da velocidade de reação em condição inicial, ou seja, aquela que assegura a velocidade constante (fase linear das curvas da figura 1). É importante notar que nos processos industriais, as enzimas atuam em condições muito distantes daquelas vigentes para a reação a velocidade constante (condição inicial).

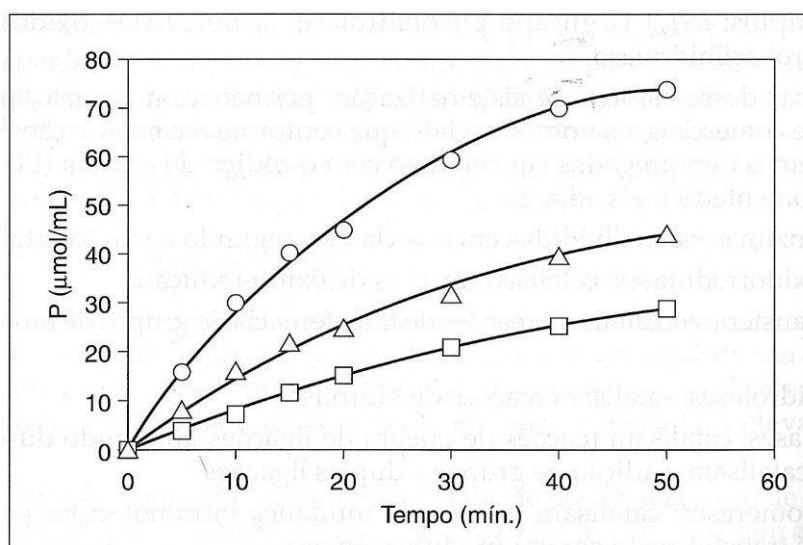


Figura 1 – Curvas de progresso de reação para três diferentes concentrações enzimáticas iniciais

Fonte: LIMA, 2001

A escolha de um método para a determinação da atividade de uma enzima produzida por fermentação, requer conhecimento prévio da faixa de concentração enzimática que permite obter uma variação linear da concentração de produto (ou substrato) com o tempo, num intervalo que não seja suficientemente grande para que os fatores acima citados venham a interferir. Há métodos variados para avaliar a variação das concentrações das espécies, como a espectrofotometria. Certa variedade de condições de ensaio, bem como de métodos de determinação, é observada para uma mesma enzima, dependendo do produtor, do investigador ou do usuário. Assim, é sempre difícil comparar resultados de atividade enzimática obtido por diversos autores, em função da falta de definição de padrões consensualmente aceitos.

A atividade é expressa em unidades de atividade. A definição proposta pela IUB (unidade internacional – IU) considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas. Em muitas situações emprega-se a atividade específica, que é expressa em unidades (IU) por massa de proteína (LIMA, 2001).

2.4 TIPOS DE FERMENTAÇÃO

A produção de enzimas em escala industrial se faz majoritariamente por fermentação submersa, embora nos países orientais haja uma tradição estabelecida de utilização de fermentação semi-sólida. Algumas vantagens atribuídas a fermentação semi-sólida seriam os maiores riscos de contaminação, as necessidades de espaço e menores rendimentos (PRIEST, 1984). Entretanto, avanços tecnológicos estão sendo gradualmente incorporados a esse processo, podendo torná-lo interessante para países que dispõem de resíduos agroindustriais de baixo custo, grupo de países no qual o Brasil se encontra.

2.4.1 CULTIVO NO ESTADO LÍQUIDO (Cultivo Submerso)

Os processos submersos possuem uma série de vantagens, segundo BON et al (2008): Facilidade de controle de variáveis físico-químicas do processo; maior eficiência na absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula, levando menores tempos de processo e consequentemente, a ganhos em produtividade. E também desvantagens, tais como: elevados custos com aeração e agitação, especialmente quando o uso de meios reacionais com alta viscosidade e reologia complexa; e formação de espuma.

2.4.2 CULTIVO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES)

Mudfett (1986) e Oriol (1987) definiram como a fermentação na qual o crescimento de microrganismos em substratos sólidos ocorre na ausência de todo líquido na forma livre. A água livre, indispensável ao crescimento dos microrganismos, é adsorvida num suporte sólido ou complexada no interior de uma matriz sólida (SOCCOL, 1992).

Segundo BON, 2008, a fermentação no estado semi-sólido apresenta as seguintes vantagens: simplicidade dos meios de cultivo (o substrato sólido pode requerer somente adição de água, embora outros nutrientes possam ser adicionados); ausência de requerimentos de máquinas e equipamentos sofisticados; possibilidade de uso de biorreatores com dimensões menores pelo fato do substrato estar concentrado; reduzido consumo de energia; baixo grau de umidade, reduzindo problemas de contaminação; condições de crescimento do microrganismo semelhantes às encontradas em seu ambiente natural; maiores concentrações de enzima em relação às fermentações submersas; estabilidade da enzima excretada e baixo nível de repressão catabólica; ausência de formação de espuma; possibilidade de extração imediata do produto através da adição direta de solventes ou por filtração do meio fermentado; pequenas quantidades de águas residuais.

Existem, entretanto, fatores limitantes nas fermentações no estado semi-sólido, tais como: menor acessibilidade ao substrato; problemas de transferência de massa (oxigênio e nutrientes), calor e quantidade de movimento; dificuldades de controle de variáveis físico-químicas, tais como pH, temperatura, oxigênio e grau de mistura; dificuldade no aumento de escala.

Diversas enzimas de importância industrial, como proteases e outras são produzidas por fermentação no estado semi-sólido (KRISHNA, 2005; COUTO E SANTOMÁN, 2006).

Dentre os microrganismos, os fungos filamentosos, principais produtores das enzimas comerciais, são também os que melhores se adaptam à fermentação no estado sólido. Sua forma de crescimento em hifas e boa tolerância à baixa atividade de água e elevada pressão osmótica conferem aos fungos vantagens com relação aos microrganismos unicelulares para a colonização de substratos sólidos (KRISHNA, 2005).

2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

2.5.1 FONTE DE CARBONO

As fontes de carbono são os principais substratos para a produção das enzimas de interesse. Resíduos agroindustriais de Castanha-do-Brasil e o óleo de Andiroba mostram-se potenciais indutores das mesmas.

2.5.2 pH

Entre os parâmetros físicos, o pH do meio de crescimento desempenha um papel importante por induzir mudanças morfológicas no organismo e também para a secreção enzimática. A mudança de pH observada durante o crescimento de um organismo também afeta a estabilidade do produto no meio. Em processos com fungos, a capacidade tamponante de alguns constituintes do meio em alguns casos elimina a necessidade de controle do pH (GUPTA *et al*, 2003).

2.5.3 TEMPERATURA

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros físicos a ser observado em um processo fermentativo. Quanto maior a temperatura, maior a velocidade da reação, até ser alcançada a temperatura ótima; acima desta temperatura a enzima começa a perder sua função, diminuindo a velocidade da catálise, até o momento em que se torna inativa (GUPTA *et al*, 2003).

2.6 MICRORGANISMO EMPREGADO

A primeira etapa da produção microbiana de uma enzimas de interesse consiste na aquisição do microrganismo produtor, que pode ser de linhagem selvagem ou modificada por genética clássica ou por técnicas de biologia molecular. A linhagem de interesse deve ser adquirida de condições de coleções de cultura científica ou de serviço, ou selecionada a partir de amostras de solo (como no presente trabalho), água, ar, tecido vegetais como caule ou frutas em decomposição, fezes de animais e víceras de insetos como os cupins e outras fontes. Segundo Bom *et al*, 2008, o microrganismo deve idealmente ter as seguintes características: ser seguro sob ponto de vista biológico (*status* GRAS – *generally recognized as safe*); apresentar elevada capacidade de síntese e excreção da enzima; suportar condições ambientais adversas, relacionadas com a pressão osmótica, a temperatura e a força iônica do meio; e ser tolerante à presença de substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou pelo próprio metabolismo celular.

2.7 MATÉRIAS-PRIMAS EMPREGADAS

Os meios de cultivo são formulados através da utilização de compostos quimicamente conhecidos (meio sintético) ou de matérias-primas naturais. Do ponto de vista industrial, os meios sintéticos são muito caros, e a opção é feita geralmente por meios que contenham apreciáveis quantidades de matérias-primas provenientes da agroindústria (LIMA, 2001), como Castanha-do-Brasil (resíduo agroindustrial), ou óleo de andiroba (matéria-prima natural).

Resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo porque, enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que devem apenas ser descartados, aqueles possuem valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995). Os resíduos podem conter muitas substâncias de alto valor. Se for empregada uma tecnologia adequada, este material pode ser convertido em produtos comerciais

ou matérias-primas para processos secundários (LAUFENBERG, et al, 2003), tais como em fermentações para produção enzimática. Dessa forma, a crescente preocupação com a despoluição ambiental, somada a irreversível prevalência das políticas ambientais, abre espaço notável para o reuso desses resíduos, tal como o resíduo da Castanha-do-Brasil.

A matéria-prima é um dos componentes mais relevantes no custo de produção, podendo representar, em alguns casos, até 75% do custo total, sendo esta uma das razões para o crescente interesse.

2.8 ÓLEO DE ANDIROBA (*CARAPA GUIANENSIS* AUBL.)

No que se trata da composição química, têm-se em porcentagem: α -felandreno (3,0); acetato de hexila (5,2); p -cimeno (6,7); limoneno (2,6); (E)- β -Ocimeno (1,1); cis-óxido de linalol (furanóide) (11,4); trans-óxido de linalol (furanóide) (6,0); linalol (7,9); nonanal (0,9); n.i. (5,3); n.i. (1,4); hexanoato de butila (2,9); α -terpineol (1,3); 2-metilburanoato de hexila (1,2); p -anisalaldeído (11,0); safrol (2,5); hexanoato de hexila (2,2); β -cariofileno (0,8); n.i. (2,3); n.i. (1,2); (E,E)- α -farneseno (21,8); dilapiol (1,4) (ZOGHBI *et al.*, 2000). Seco-iridoides isolados da casca do caule: 7-metoxididerrosideo; 6'-O-acetildiderrosideo; 8-O-tigloyldiderrosideo. Iridóides conhecidos: loganetina, loganina e secxiloganina, diderrosideo, kingsideo (ARAÚJO, 2007).

2.9 CASTANHA-DO-BRASIL (*BERTHOLLETIA EXCELSA*)

A amêndoa de castanha-do-Brasil apresenta a seguinte composição química centesimal em g/100g: umidade 4,40, proteína bruta 17,00, lipídios 67,00, carboidratos 7,00, valor energético 751kcal e sais minerais 3,60, em média, além de quantidades elevadas de vitaminas E e B₁. (COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA, 2000 e SOUZA, 1984). Segundo Castro apud Teixeira, a fração albumina, a *excelsina*, é a única completa de origem vegetal conhecida, o que levou a castanha-do-Brasil ser chamada de *carne vegetal*. É uma amêndoa oleaginosa de elevado valor energético, rica em proteínas de alto valor biológico.

2.10 APLICAÇÕES DAS ENZIMAS NA COSMETOLOGIA

A pele, por sua organização estrutural e bioquímica, funciona como uma barreira de exclusão à penetração de substâncias sendo, no entanto, uma barreira seletiva e semi-permeável (SIMÕES, 2001b). Substâncias de baixo peso molecular (massa molar) e de elevada lipofilicidade permeiam facilmente através da pele, podendo atuar a nível dérmico e mesmo sistêmico.

Em geral, as enzimas não penetram na pele por terem massa molecular elevada e caráter pouco lipofílico (SIMÕES, 2001). Elas atuam por períodos reduzidos sobre a superfície externa da pele e apenas sobre um substrato específico.

O estudo de enzimas na área cosmética é chamado de enzimocosmética, a qual se subdivide em direta e indireta. O emprego de enzimas em produtos cosméticos visa facilitar ou dificultar as reações bioquímicas da pele, proteger ou reparar a pele como também, em alguns casos, destruir ou remover intencionalmente, parcial ou totalmente, algumas estruturas da pele (SANTOS, 2004). Dentre essas enzimas podem-se destacar as proteases.

As queratinases são enzimas proteolíticas que têm como substrato um grupo de proteínas fibrosas e insolúveis denominadas queratinas. As queratinas têm funções estruturais e protetoras e são os principais constituintes das estruturas da epiderme, cabelos, unhas, lâ e penas de aves, dentre outras. A estabilidade mecânica e a baixa biodegradabilidade apresentada pelas queratinas devem-se ao grande número de pontes dissulfeto intercadeias.

As queratinases são, em sua maioria endopeptidases do tipo serina, cisteína e metalopeptidases, embora também já tenham sido descritas exopeptidases do tipo amino-peptidase com esta atividade. O mecanismo de ação dessas enzimas ainda está em estudo. Acredita-se

que as queratinases são simples peptidases que atuam em conjunto com agentes redutores, como o sulfito e similares, ou com outras enzimas com atividade dissulfeto-redutase. Embora inicialmente estas enzimas tenham sido muito estudadas em fungos dermatófitos, atualmente elas têm sido isoladas e caracterizadas de procariotos representados por vários gêneros de bactérias, em especial *Bacillus* e *Streptomyces*.

São muitos os nichos industriais com aplicação das queratinases. Os segmentos com maior potencial são as que se relacionam com áreas de cosmética (*peeling* dermatológico enzimático, produção de hidrolisados de queratinas para cremes capilares e depilatórios) e farmacêutica (pomadas cicatrizantes e eliminação da queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses).

3.DESCRICÃO METODOLÓGICA

Para a produção de proteases através de fermentações líquidas e sólidas utilizando resíduos de Castanha-do-Brasil e óleo de andiroba como fonte de carbono e otimização de pH e temperatura, excretado pelo fungo isolado da microbiota Amazônica, utilizou-se o laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM, da UFAM. Pesquisa de cunho experimental para análises quantitativas.

3.1 PRODUÇÃO DE PROTEASES

3.1.1 SELEÇÃO DO MICRORGANISMO

A escolha do microrganismo para a produção da referida enzima (proteases) foi realizada a partir de consultas ao estudo anterior de PAIVA, 2008, integrante do grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM. O microrganismo escolhido foi um fungo filamentoso, isolado da Região Amazônica, designado F7. Sua caracterização completa ainda está em andamento. A classificação morfológica foi realizada, indicando tratar-se de um *Penicillium*. Os indícios de que o fungo F7 seria um bom produtor de proteases foram analisados a partir da tabela 2.

Tabela 2 – Atividades enzimáticas para Proteases totais (PAIVA, 2008).

Isolados	Atividade (U/mL)	Atividade específica (U/mg proteínas)
F1	33,38 ± 3,57	90,91 ± 4,62
F2	16,18 ± 1,87	23,15 ± 2,07
F4	28,88 ± 2,58	37,25 ± 7,55
F5	10,40 ± 0,57	23,97 ± 0,85
F6	50,85 ± 2,69	39,35 ± 0,20
F7	58,53 ± 1,73	184,84 ± 6,57
F8	17,68 ± 0,39	22,31 ± 1,82
F11	54,50 ± 0,35	45,17 ± 1,84
F12	17,83 ± 1,66	41,12 ± 4,23
F13	12,68 ± 0,53	38,94 ± 2,62
F14	11,58 ± 0,39	12,44 ± 1,32
F15	3,28 ± 0,53	7,28 ± 0,65
F17	56,15 ± 0,00	24,15 ± 0,00
F18	18,80 ± 0,42	29,38 ± 1,42
F19	9,43 ± 0,67	35,42 ± 1,15

F20	5,40 ± 0,14	15,88 ± 0,80
F25	13,73 ± 0,11	21,85 ± 1,26
F26	7,55 ± 0,21	15,09 ± 1,60
F31	29,53 ± 0,39	31,41 ± 3,36
F33	9,75 ± 0,21	16,47 ± 0,99

FONTE: Paiva, 2008.

3.1.2 MEIOS DE CULTURA

Os Meios de cultura utilizados foram o BDA – contendo batata descascada, água destilada, dextrose e ágar, e o Sabouraud – contendo peptona, dextrose, Agar e água destilada. O meio foi distribuído em tubos de ensaio, autoclavado a 121°C durante 15 minutos. Após a esterilização, o meio foi solidificado em tubos inclinados conforme mostra a Figura 2.

Figura 2 – Tubo Contendo Meio Pda Inclinado Para Repicagem Das Cepas



Fonte: SPIER, 2005.

3.1.3 REPIQUE DO FUNGO

Após a distribuição e solidificação dos meios BDA esterilizado em tubos de ensaio previamente esterilizados, procedeu-se a semeadura das cepas nas placas que posteriormente foram armazenadas em condição de cultivo a temperatura ambiente durante seis dias.

3.1.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE ESPOROS

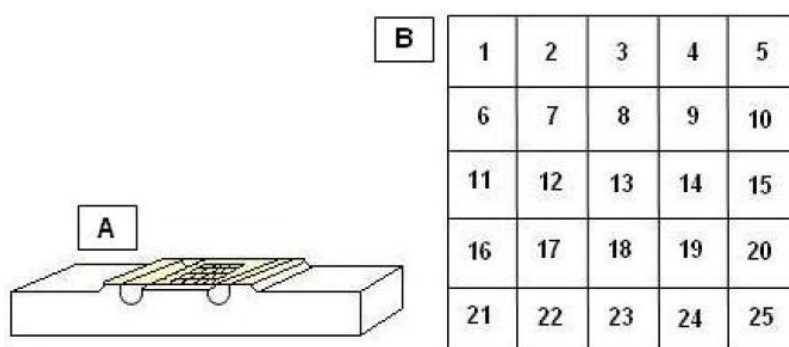
Após o período de seis dias, na biomassa de fungo formada (micélio) na superfície do meio contido nos tubos foi adicionado 4mL de solução de sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentração de 0,5 mg/mL e homogeneizada. Em seguida, procedeu-se uma diluição, adicionando 100µL da solução de esporos em sulfato de amônio concentrada a 900µL de água destilada e deionizada estéril.

3.1.5 CONTAGEM DA SOLUÇÃO DE ESPOROS EM CÂMARA DE NEUBAUER

3.1.5.1 PROCEDIMENTO DE CONTAGEM

A concentração de esporos na suspensão obtida foi estimada pela contagem em microscópio usando Câmara de Neubauer. Para a contagem, a suspensão de esporos foi adicionada sobre a Câmara de Neubauer, de acordo com a figura 3a. Foram contados todos os esporos presentes nos quadrículos ímpares, conforme a Figura 3b.

FIGURA 3 – CÂMARA DE NEUBAUER (A) e QUADRÍCULOS (B) PARA A CONTAGEM DOS ESPOROS



Fonte: SPIER, 2005

O resultado foi obtido usando a equação e expresso em número de esporos por ml de suspensão.

$$N = \frac{ne \cdot F}{nq \cdot Vq}$$

Onde:

F = fator de diluição (inverso da diluição);

N = número de esporos por ml de suspensão (esporos/ml);

ne = número total de esporos contados;

nq = número de quadrículos contados;

Vq = volume do quadrículo: 4×10^{-6} mL

3.2 SELEÇÃO DO MELHOR MÉTODO DE FERMENTAÇÃO

Para a produção das enzimas proteases, foram utilizados dois tipos de fermentação: líquida e semi-sólida.

3.2.1 FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMI-SÓLIDO (FES)

A fermentação semi-sólida foi realizada somente com uma das fontes de carbono de interesse, o resíduo de castanha-do-brasil.

Em erlenmeyers de 125mL foram adicionados 2,5g de resíduo de castanha-do-brasil e estes foram esterilizados. Posteriormente, foi inoculada 1mL da solução de esporos em sulfato de amônio a 0,5mg/mL (item 3.1.4). Os erlenmeyer foram armazenados a temperatura de 25°C durante 7 dias, em condição estacionária. Foram realizadas filtrações a vácuo periódicas a cada

24h para coleta das amostras, armazenadas para análise de determinações de atividade proteolítica e dosagem protéica das referidas amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.2 FERMENTAÇÃO NO ESTADO LÍQUIDO OU SUBMERSA (FSM)

A fermentação no estado líquido foi realizada com as duas fontes de carbono de interesse: o resíduo de castanha-do-brasil e o óleo de andiroba.

Em erlenmeyers de 125mL foram adicionados 2,5g de resíduo de castanha-do-brasil em 25mL do meio fermentativo líquido de Vogel (1956) – contendo:

1. Uma solução de traços de elementos (micronutrientes) – 0,5mL da solução de traços por 100mL de meio: Ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), Sulfato de Zinco Heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), Sulfato de amônio e ferro hexahidratado ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$), Sulfato de Cobre Pentahidratado ($Cu(SO_4) \cdot 5H_2O$), Sulfato do manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$), Ácido Bórico (H_3BO_3), Molibdato do sódio dihidratado ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) e água destilada e deionizada.

2. Uma solução de sais de Vogel (macronutrientes) – 2mL da solução de sais por 100mL de meio: Citrato de Sódio Pentahidratado ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 5H_2O$), Fosfato de potássio (KH_2PO_4), Nitrato de Amônio ($(NH_4)^+(NO_3)^-$), Sulfato de Magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Cloreto de Cálcio Dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), H_2O destilada e deionizada.

3. Uma solução de Biotina: 0,1mg/mL – 0,5mL da solução Biotina por 100mL de meio líquido de Vogel.

Procedeu-se a esterilização. Posteriormente, foi inoculada 1mL da solução de esporos contendo nos mesmos. Armazenou-se em temperatura ambiente durante 7 dias, realizando filtrações a vácuo periódicas de 24h em 24h para coleta das amostras, armazenadas para posteriores determinações de atividade proteolítica e dosagem protéica das referidas amostras. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.3 DETERMINAÇÃO DO pH ÓTIMO E TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Os efeitos desses parâmetros foram avaliados em meio fermentativo anteriormente definido. A influência do pH de cultivo foi verificada no meio líquido, utilizando diferentes sistemas tamponantes. Similarmente estudou-se o efeito de diferentes temperaturas sobre a produção das enzimas pelo microrganismo selecionado. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO PH E ESTABILIDADE DO PH NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação do pH de melhor atividade proteolítica, foram realizadas dosagens enzimáticas segundo Leighton et al (1973), diferindo no pH do tampão o qual a caseína foi diluída.

Para a realização do teste de estabilidade ao pH, incubou-se cada extrato enzimático, durante 24 horas, a temperatura ambiente, em tampão McIlvaine com pH 7,5, 8,0, e 8,5, assim como em tampão Tris-HCl nos mesmos pHs. Após esse período determinou-se a atividade proteolítica, conforme descrito no item 3.9. O extrato bruto e diluído também foram submetidos ao procedimento, para fins comparativos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E ESTABILIDADE TÉRMICA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi analisada segundo a metodologia de Leighton et al. (1973), no entanto, submeteu-se a reação enzimática a diferentes temperaturas, a saber: 5°C; 22°C; 36°C; 50°C; 65°C; 75°C.

Para a realização do teste de estabilidade à temperatura, incubou-se cada extrato enzimático durante diferentes tempos (5, 10, 20, 30 e 60 minutos) em diferentes temperaturas (36°C, 50 e 75°C). Após este período, determinou-se a atividade proteolítica residual (% de atividade comparada com a encontrada quando a dosagem enzimática era realizada segundo a metodologia de Leighton et al (1973) sem modificações. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.6 DETERMINAÇÃO DO K_M E $V_{MÁX}$ NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foi realizada dosagem enzimática conforme Leighton et al (1973), modificado nas concentrações de caseína. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 DETERMINAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE DAS PROTEASES

Foram adicionados PMSF, DTT, EDTA, Leupeptina, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ e $MnSO_4$ em diferentes ensaios enzimáticos e atividade mensurada segundo Leighton et al (1973). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 DETERMINAÇÃO DA O PERFIL PROTEICO POR ELETROFORESE

O perfil protéico foi estudado por eletroforese em sistema denaturante (LAEMMLI, 1970), PAGE-SDS em placa, em gel de resolução a 12%, corando com prata.

3.9 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE DAS PROTEASES

A atividade de protease foi determinada por meio da incubação do filtrado de cultura com caseína a 1% em meio tamponado, pH 7,4 por 60 min, a temperatura ambiente, seguida de precipitação com ácido tricloroacético, posterior centrifugação, retirada do sobrenadante e leitura da absorbância a 280 nm. Uma unidade da enzima foi determinada como a elevação do valor de 0,1 na absorbância a 280 nm por mililitros por minuto. Quando submetida a incubação com azocaseína, a absorbância era lida a 440 nm (Leighthon et al, 1973).

3.10 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNAS

A concentração de proteínas foi determinada, em triplicata, pelo método descrito por Bradford (1976) utilizando albumina sérica bovina como padrão.

3.11 TRATAMENTO DE DADOS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os valores obtidos foram apresentados na forma de média ponderada, com os respectivos desvios padrão. O limite de significância para todas as análises estatísticas foi assumida o valor de $\alpha = 0,05$, resultando, portanto em um intervalo de confiança de 95%.

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA ENZIMÁTICA

4.1.1 DETERMINAÇÃO DO MELHOR SUBSTRATO PARA PROTEASES

Foram analisadas amostras de fermentação líquida em modo estacionário utilizando castanha-do-brasil como fonte de carbono. A dosagem da atividade enzimática foi realizada a fim de definir, entre dois diferentes substratos, o melhor para a reação enzimática e quantificação de enzimas proteolíticas.

A atividade enzimática utilizando caseína como substrato apresentou pico de $7,129 \pm 0,4$ U/mL e atividade específica de 1,893 U/mg de proteína, em 144h de cultivo em fermentação líquida modo estacionário, como mostra a tabela 3, a seguir.

Tabela 3 - Fermentação em estado líquido estacionário utilizando caseína como substrato.

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
24h	1,416666667	0,281914	19,89979	0,404535646
48h	3,648148148	0,112263	3,077248	1,671538595
72h	4,111111111	0,409192	9,953324	1,373487357
96h	6,25	0,290009	4,640136	1,842107767
120h	5,361111111	0,43063	7,526341	1,347490535
144h	7,12962963	0,43063	6,040008	1,893627926
168h	5,185185185	0,06415	1,237179	1,985196764

A atividade enzimática utilizando azocaseína como substrato apresentou pico de $2,666 \pm 0,03$ U/mL e atividade específica de 1,336 U/mg de proteína, em 144h de cultivo em fermentação líquida modo estacionário, de acordo com a tabela 4, a seguir.

Tabela 4 - Fermentação em estado líquido estacionário utilizando azocaseína como substrato.

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
24h	0,25	0,048113	19,24501	0,093557726
48h	0,333333333	0,100154	30,04626	0,079733459
72h	0,462962963	0,039284	8,485281	0,328234066
96h	1,222222222	0,137493	11,24943	0,683804908
120h	2,534722222	0,019642	0,774912	1,849759197
144h	2,666666667	0,039284	1,473139	1,336102852
168h	1,768518519	0,21033	11,893	0,584007076

A Caseína pode ser definida como uma proteína micelar, classificada como fosfoproteína, devido à presença de fósforo e a azocaseína é um derivado da caseína, ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida (SGARBIERI, 1996).

Quando comparadas as atividades enzimáticas nos dois tipos de substrato, pode-se observar que a atividade proteolítica em caseína foi nitidamente superior a atividade em azocaseína, como pode ser observado na figura 4, e assim, estabeleceu-se caseína como o substrato de todas as quantificações da atividade enzimática no decorrer do estudo.

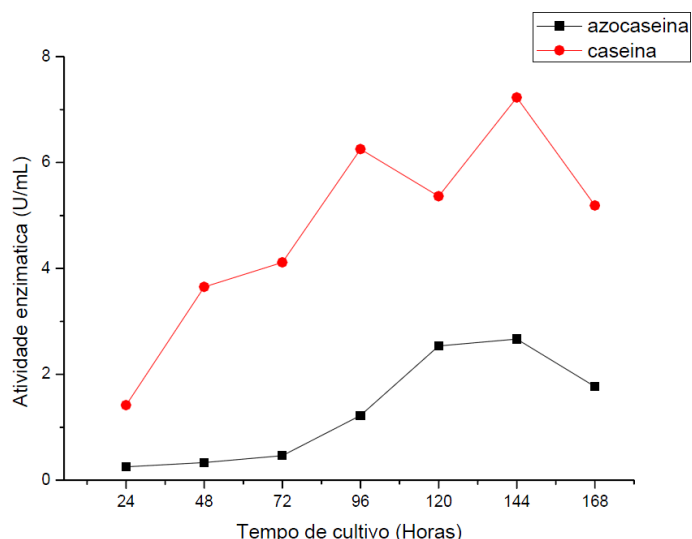


Figura 4 – Gráfico comparativo das atividades enzimáticas utilizando caseína e azocaseína como substrato.

Ambos os substratos são, como se pode observar, hidrolisados por proteases. Caseína costuma ser utilizada na determinação quantitativa em pH neutro e alcalino, como em Castillo-Yañez, 2004, que caracteriza proteases de acordo com a metodologia de Garcia-Carreño e Haard (1993) e Simpson e Haard (1987). Dessa forma, têm-se o primeiro indicativo de que as proteases, as quais melhor apresentaram maior atividade, podem ser classificadas em proteases alcalinas.

4.1.2 SELEÇÃO DA MELHOR FONTE DE CARBONO PARA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PROTEASES

Para a determinação da melhor fonte de carbono na atividade enzimática, foram analisadas amostras fermentativas com 2% da fonte de carbono, a saber: óleo de andiroba e castanha-do-brasil, em meio líquido de Vogel (1956). Foi observado, quando utilizado castanha-do-brasil como fonte, pico de $7,129 \pm 0,4$ U/mL e atividade específica de 1,893 U/mg de proteína, em 144h de cultivo em fermentação líquida estacionária, de acordo com a tabela 5.

Tabela 5 – Atividade de enzimas proteolíticas em fermentação líquida estacionária utilizando castanha-do-brasil como fonte de carbono.

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
24h	2,601851852	0,576235	22,14713	0,649529052

48h	3,648148148	0,273579	7,49913	1,301950325
72h	4,111111111	0,737725	17,94467	0,998358758
96h	6,25	0,084863	1,3578	2,139373353
120h	5,361111111	0,403496	7,526341	1,347490535
144h	7,12962963	0,43063	6,040008	1,893627926
168h	5,111111111	0,19245	3,765328	1,708802048

Em fermentação líquida estacionária contendo 2% de óleo de andiroba, obteve-se pico de $1,138 \pm 0,13$ U/mL e atividade específica de 0,486 U/mg de proteína, em 72h de cultivo, como pode-se observar na tabela 6.

Tabela 6 – Atividade de enzimas proteolíticas em fermentação líquida estacionária utilizando andiroba como fonte de carbono.

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
24h	0,340277778	0,019642	5,7723	0,364180052
48h	0,444444444	0,146986	33,07189	0,093791974
72h	1,138888889	0,137493	12,07255	0,486342355
96h	0,981481481	0,195105	19,87859	0,292025916
120h	0,833333333	0,039284	4,714045	0,695274396
144h	0,625	0,039284	6,285394	0,524630365
168h	0,75	0,117851	15,71348	0,294158813

Pode ser observado, quando comparado ambos os meios fermentativos, que a produção de enzimas proteolíticas utilizando castanha-do-brasil como fonte de carbono mostra-se nitidamente superior a produção de enzimas proteolíticas em óleo de andiroba (Figura 5), sendo estabelecido que após este estudo, que todas as fermentações seriam realizadas com castanha-do-brasil como fonte de carbono.

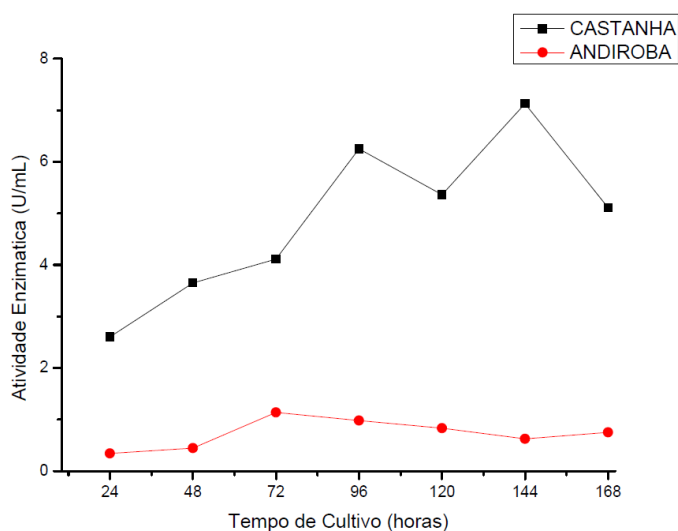


Figura 5 – Comparação entre as fontes de carbono castanha-do-brasil e andiroba em fermentação líquida estacionária.

O resultado superior na produção proteolítica pelo fungo filamentoso encontrado na fermentação com castanha-do-Brasil, se deve, principalmente, a quantidade de proteína que o resíduo da castanha possui. A castanha-do-Brasil é chamada de “carne vegetal” por ser um alimento rico em proteínas, possuindo na amêndoa todos os aminoácidos essenciais (PACHECO, 2006). Em sua composição centesimal, têm-se 14,2% da amêndoa da castanha-do-Brasil somente de caráter protéico (SOUZA, 2004).

4.1.3 SELEÇÃO DO MELHOR MODO DE FERMENTAÇÃO

Após selecionada a fonte de carbono (castanha-do-Brasil), o melhor método de fermentação, semi-sólido ou líquido foi analisado. Primeiramente a fermentação líquida, em dois modos: líquido e estacionário foi realizada. Observou-se, pico de $7,129 \pm 0,4$ U/mL e atividade específica de 1,893 U/mg de proteína, em 144h de cultivo em fermentação líquida estacionária, de acordo com a tabela 5. Em fermentação líquida, em condição sob agitação de 150 rpm (*shaker*) a 28°C, observou-se pico de $6,925 \pm 0,6$ U/mL e atividade específica de 1,349 U/mg de proteína, em 72h de cultivo, como mostra a tabela 7. Tal resultado mostra-se bastante inferior ao obtido por Neves (2006), em que a levedura *Candida intermedia* apresentou em extrato de malte suplementado com gelatina 1%, sob agitação (140 rpm), durante 72h a atividade enzimática de $273 \pm 0,00$, e superior ao obtido por Tiagol (2007), onde a atividade proteolítica do fungo *Mahararva fimbriolata* apresentou atividade enzimática de $1,88 \pm 0,019$ em meio mínimo acrescido de gelatina.

Tabela 7 – Atividade proteolítica na fermentação em estado líquido agitado.

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
24h	2,833333333	0,182151	6,428861	1,106273219
48h	5,138888889	0,269793	5,250019	1,454686631
72h	6,925925926	0,661395	9,549548	1,349275062
96h	5,601851852	0,393818	7,030139	1,424870032
120h	6,12037037	0,057824	0,94478	2,424820593
144h	5,62962963	0,239491	4,254117	1,504490771
168h	6,333333333	0,196419	3,101346	2,095750313

Quando comparadas (Figura 6), a fermentação líquida estacionária foi definida como a melhor por apresentar picos de atividade equivalentes ($7,129 \pm 0,4$ U/mL e $6,925 \pm 0,6$ U/mL mesmo em um tempo de cultivo maior em relação a fermentação em agitação. Isso se deve, principalmente, ao objetivo do presente estudo, ou seja, é mais apropriada visto que causa menos ônus a indústria, agregando maior valor as enzimas proteolíticas.

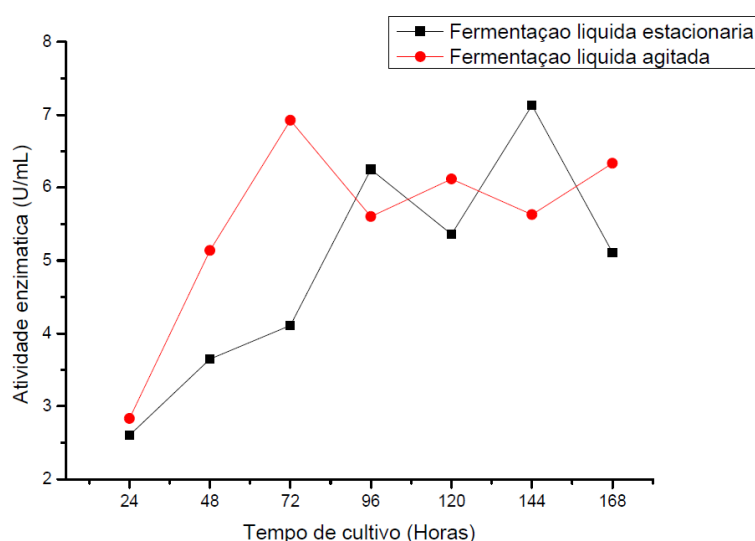


Figura 6 – Comparação entre fermentação líquida nos modos estacionário e agitado.

Vários tempos de cultivo de produção de proteases extracelular tem sido relatada na literatura, refletindo a variabilidade na produção proteolítica em diferentes médias de tempo, assim como várias médias de produção enzimática.

Após as fermentações líquidas em diferentes modos, foi realizado o ensaio fermentativo em meio semi-sólido, consistindo apenas no resíduo da castanha-do-Brasil junto ao inóculo de 1mL da solução de esporos, em Sulfato de Amônio a 0,5mg/mL, do fungo filamentoso designado F7. Foi detectado pico de produção de $17,018 \pm 1,7$ U/mL e atividade específica de 2,472 U/mg de proteína (Tabela 8), em 72h de cultivo em fermentação semi-sólida, a temperatura ambiente, sem agitação. Observa-se que a atividade proteolítica atinge um máximo e decai, e isto sugere uma menor disponibilidade de nutrientes ou a liberação de metabólitos tóxicos (ROMERO et al., 1998).

Horas de cultivo	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
------------------	------------------	---------------	-----------------------------	---

24h	4,805555556	0,6176	12,8518	1,085504415
48h	5	0,315902	6,742578	1,340418998
72h	17,01851852	1,741455	10,2327	2,472838456
96h	12,62962963	0,345086	2,732353	1,741329809
120h	11,5462963	0,369907	3,203686	1,691944424
144h	14,69444444	1,932769	13,15306	1,47052719
168h	13,14814815	1,246703	9,48197	1,534649012

Tabela 8 – Atividade proteolítica em fermentação sólida utilizando castanha-do-brasil como fonte de carbono.

Quando comparadas as atividades enzimáticas nos diferentes tipos fermentativos, semi-sólido e líquido estacionário, observa-se uma superioridade na mesma em fermentação semi-sólida, a partir de 72h de cultivo, como mostra a figura 7. Isso indica que a fermentação em estado semi-sólido é o mais indicado para aplicação industrial por possuir maior produção proteolítica, além de não precisar de suplementos ao meio, como na fermentação líquida, o qual sais de Vogel (1956) são necessários.

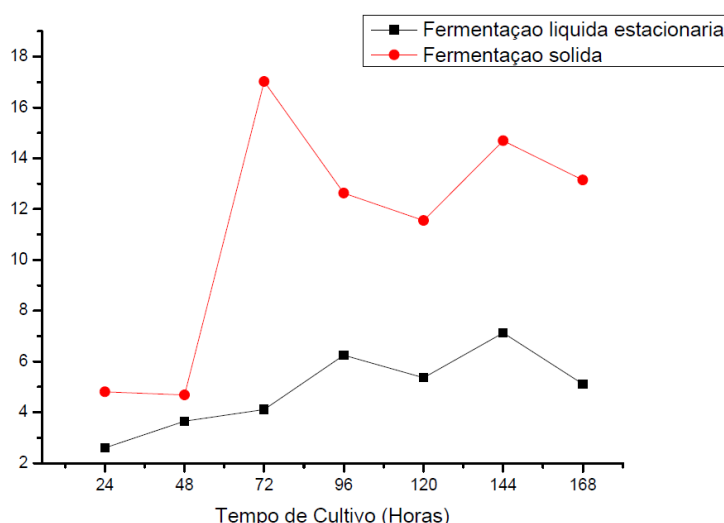


Figura 7 – Comparação entre as fermentações líquida estacionária e sólida na produção de enzimas proteolíticas.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

4.2.1 TEMPERATURA ÓTIMA DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

Para determinação da melhor temperatura de produção do complexo enzimático proteolítico, foram testadas temperaturas de 22°C, 36°C e 40°C, tanto em fermentação líquida, quanto em fermentação semi-sólida, visto que a temperatura poderia influenciar significativamente a produção. As atividades estão expressas na tabela 9.

Tabela 9 – Atividade proteolítica em diferentes modos fermentativos e temperaturas.

Temperatura		Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
22°C	Ferm. Líquida	6,990741	0,315902	4,518867	32,98958725
	Ferm. Semi-sólida	10,00926	0,169725	1,69568	33,35924116
36°C	Ferm. Líquida	5,425926	0,248969	4,588508	32,64366758
	Ferm. Semi-sólida	10,90741	0,548098	5,025008	33,43067753
40°C	Ferm. Líquida	4,333333	0,348055	8,032028	33,33623765
	Ferm. Semi-sólida	13,11111	0,364302	2,778576	33,56531365

Dentre as temperaturas testadas, a melhor produção proteolítica foi observada em fermentação líquida a 22°C atividade de $6,990 \pm 0,31$ U/mL e atividade específica de 32,989 U/mg de proteína, em 144h de cultivo. Em fermentação semi-sólida, a melhor produção proteolítica foi observada em 40°C, com atividade de $13,111 \pm 0,36$ U/mL e atividade específica de 33,565 U/mg de proteína, em 72h de cultivo.

O tempo de cultivo foi baseado nos picos de produção no estudo da cinética enzimática. A melhor produção enzimática de proteases foi também observada nesta faixa de temperatura, entre 37 e 42°C, segundo Bidochka and Khachatourians (1987).

4.2.2 PH ÓTIMO DE PRODUÇÃO DO COMPLEXO ENZIMÁTICO

A influência do pH na produção enzimática foi estudada, pois a mudança no potencial hidrogeniônico poderia acarretar em uma mudança significativa na produção enzimática. Foram testados pH entre 7 e 9,5, como pode ser visto na tabela 10.

Tabela 10 – Produção proteolítica em diferentes pHs.

pH	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coeficiente de variação (%)	Atividade Específica (U/mg de proteína)
7	1,58333333	0,237333	14,98948	27,4946662
7,5	2,15740741	0,208488	9,663803	30,48045658
8	2,12962963	0,2228	10,46192	36,16638907
8,5	1,82407407	0,097552	5,348048	37,7668357
9	2,51851852	0,444573	17,65216	38,05333111
9,5	1,81481481	0,281	15,48366	29,86035413

Foi detectado pico de produção de $2,510 \pm 0,44$ U/mL e atividade específica de 29,860 U/mg de proteína, em fermentação líquida estacionária, em pH 9,0. Esse resultado pode ser visto mais claramente na figura 8. A produção enzimática proteolítica apresentou um continuidade entre o pH 7,5 a 9,0 (2,157 / 2,129 / 1,824 / 2,518, dessa forma, a melhor produção foi em pH alcalino. A

produção mesmo após otimização em fermentação líquida, não foi superior a fermentação semi-sólida.

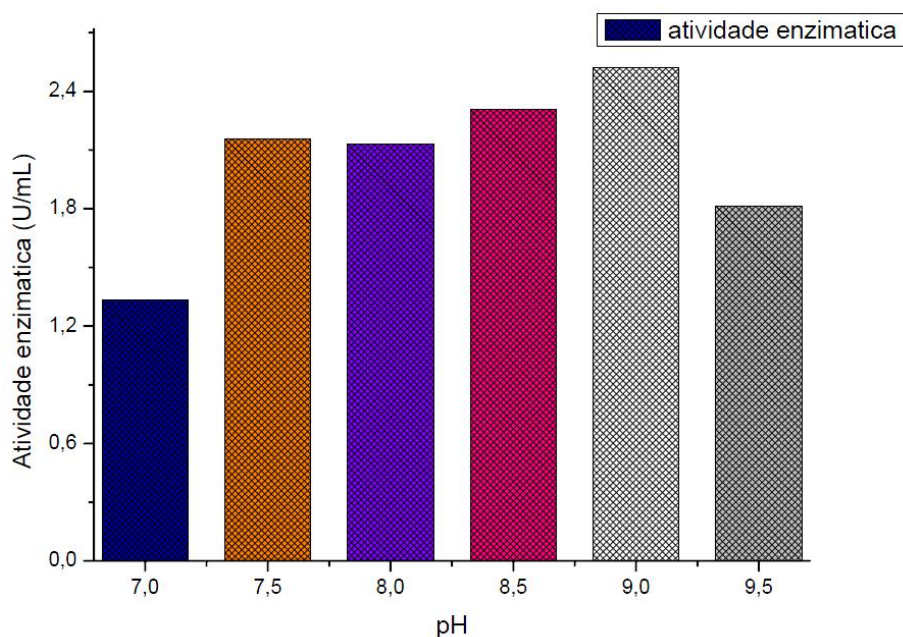


Figura 8 – Gráfico da atividade enzimática em diferentes pH, em fermentação líquida.

4.3 EFEITOS DE PARÂMETROS NA DOSAGEM DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos na atividade proteolítica, foi utilizado o extrato enzimático bruto obtido por fermentação semi-sólida do fungo selecionado do solo amazônico, designado F7, a 40°C, sem agitação, em cultivo por 72h.

4.3.1 EFEITO DA TEMPERATURA

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi analisada segundo a metodologia de Leighton et al. (1973), no entanto, submeteu-se a reação enzimática a diferentes temperaturas, a saber: 5°C; 22°C; 36°C; 50°C; 65°C; 75°C. Foram detectados picos de atividade de $8,06 \pm 0,55$ U/mL a 22°C, de $8,82 \pm 0,06$ U/mL a 36°C, de $8,19 \pm 0,59$ U/mL a 65°C e de $8,54 \pm 0,94$ U/mL a 75°C (Tabela 11).

Tabela 11 – Influência da temperatura na atividade proteolítica.

Temperatura (°C)	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
5	7,83	0,55	7,020918
22	8,06	0,20	2,438299
36	8,82	0,06	0,668132
50	7,56	0,12	1,559794
65	8,19	0,59	7,190916
75	8,54	0,94	11,00488

Os picos de produção se mantiverem nas mais variadas temperaturas, diferente do observado por Silva (2009) em que melhor temperatura para a atividade proteolítica foi entre 60°

e 65° C, resultado semelhante ao encontrado por Merheb et al. (2007), com o fungo termofílico *Thermoascus aurantiacus*.

4.3.2 ESTABILIDADE TÉRMICA

Baseado nos resultados descritos no item 4.3.1, foram selecionadas três temperaturas diferentes para análise da estabilidade térmica: 36°C, 50°C e 75°C. Procedeu-se a quantificação da atividade proteolítica, segundo a metodologia Leighton et al. (1973), diferindo nos tempos propostos para a reação enzimática: 5, 10, 20, 30 e 60 minutos.

Tabela 12 - Estabilidade térmica em diferentes tempos e temperaturas

	5'	10'	20'	30'	60'
36 °C	100	100	100	100	100
50 °C	100	98,4252	100	100	100
75 °C	100	100	100	100	100

Foram observados resultados bastante satisfatórios frente à estabilidade térmica, visto que em todos os testes observou-se a manutenção de 100% ou muito próximo disso, tal como 98,45% em 10 minutos, a 50°C (Tabela 12). Observou-se pico de atividade de $11,03 \pm 0,08$ a 75°C, na reação enzimática realizada por 60 minutos, como é mostrado na figura 9.

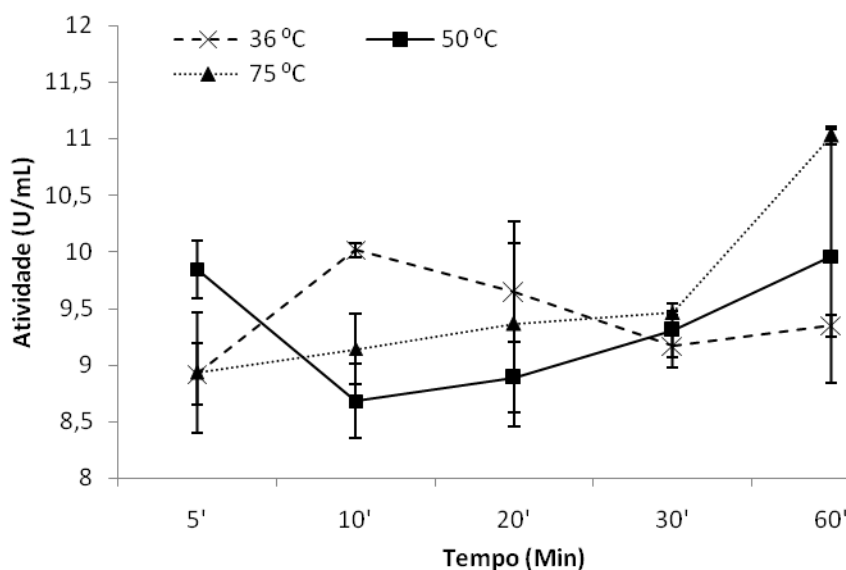


Figura 9 – Gráfico da atividade enzimática frente a diferentes tempos e temperaturas.

Os resultados obtidos neste estudo mostram grande estabilidade térmica entre 36°C a 75°C, diferente do obtido por Silva (2009), o qual a atividade enzimática só se manteve estável até 60°C, com perda de atividade de forma significativa quando a temperatura foi superior a 60°C, restando cerca de 22% da atividade após incubação a 65°C, e menos de 10% quando expostas a temperaturas superiores. Resultado semelhante ao encontrado por Silva (2009) foi relatado por Merheb et al. (2007).

4.3.3 EFEITO DO PH

O efeito do pH na atividade proteolítica foi analisado segundo a metodologia Leighton et al. (1973), sendo o substrato caseína diluído em diferentes tampões de pH entre 4 a 11. Detectou-se pico de produção em pH 8,0, com atividade enzimática de $32,45 \pm 0,72$ U/mL (Tabela 13).

Tabela 13 – Influência do pH na atividade proteolítica

pH	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
4	10,11	1,81	17,8719
5	6,55	0,49	7,49913
6	12,33	0,35	2,86665
7	22,14	2,26	10,2172
8	32,45	0,72	2,22759
9	7,52	0,26	3,49198
10	5,18	0,06	1,11717
11	5,69	0,41	7,28448

A melhor atividade enzimática foi detectada na faixa de pH foi entre 7 e 8, como pode ser observado na figura 10.

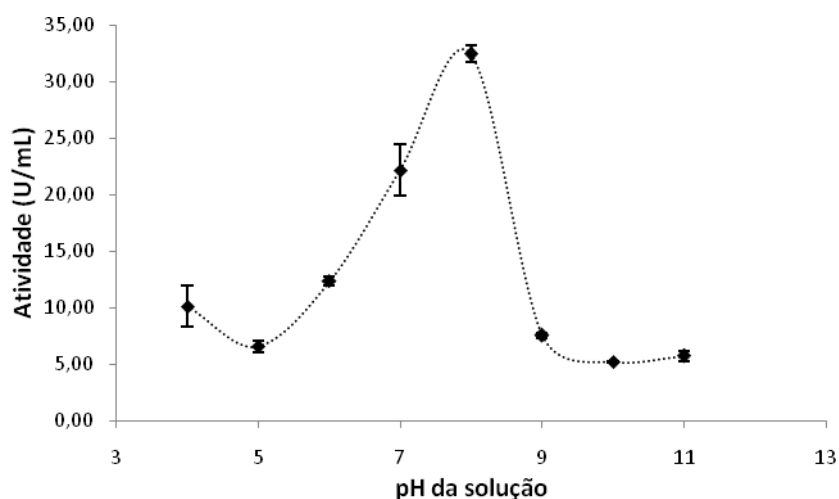


Figura 10 – Gráfico da atividade enzimática em diferentes pHs.

A partir do pH 9,0 foi observada queda sensível na atividade proteolítica. Dessa forma, a atividade proteolítica é melhor em pH levemente alcalino. Confirma-se aqui a presença de proteases alcalinas no extrato bruto enzimático analisado.

Eduardo et al obteve pico de atividade proteolítica no pH 6,5, sendo que no pH 7,5 houve uma pequena queda da atividade catalítica que se manteve estável até o pH 9,0. Já Germano et al (2002), observou que o extrato bruto em solução salina (NaCl 1%) de protease de *Penicillium* sp. Mostrou maiores atividades no pH entre 6,0 e 9,0, sendo o pH 6,5 tido como ótimo.

4.3.4 ESTABILIDADE DE PH

Para a realização do teste de estabilidade frente a diferentes pHs, cada extrato enzimático foi exposto, durante 24 horas, a temperatura ambiente, a tampão Mcllvaine com pH 7,5, 8,0, e 8,5, assim como a tampão Tris-HCl nos mesmos pHs. Sob as mesma condições, exceto pela adição de tampões ao meio, incluiu-se o extrato bruto e o mesmo extrato diluído. Observou-se pico de produção em Tampão Mcllvaine pH 8,5 de $6,72 \pm 0,24$ U/mL (Tabela 14).

Tabela 14 – Estabilidade do pH na atividade proteolítica.

pH	Atividade (U/mL)	Desvio Padrão	Coefficiente de variação (%)
Extrato	15,83	0,00	0
Extrato Diluído	7,33	0,08	1,07
7,5 (MacIlvaine)	6,56	0,08	1,2
8 (MacIlvaine)	6,42	0,04	0,61
8,5 (MacIlvaine)	6,72	0,24	3,51
7,5 (Tris-HCL)	6,06	0,24	3,89
8,0 (Tris-HCL)	6,47	0,35	5,46
8,5 (Tris-HCL)	6,42	0,20	3,06

A estabilidade de pH, quando comparada ao extrato diluído, foi muito satisfatória, pois se manteve estável entre 82 a 91%. Observou-se a maior porcentagem de estabilidade quando o extrato bruto foi submetido a tampão Mcllvaine com pH 8,5, mantendo 91,67% de sua atividade residual.

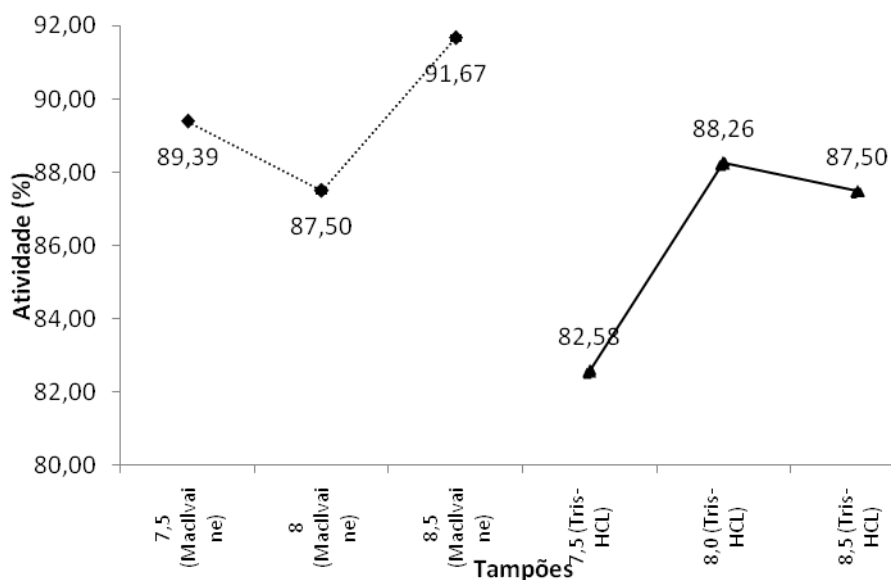


Figura 11 – Atividade residual frente a variação no pH.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al (2009), onde o extrato teve grande estabilidade a variações de pH, pois apresentaram atividade proteolítica residual maior do que 80%.

4.3.5 Km E $V_{\text{máx}}$

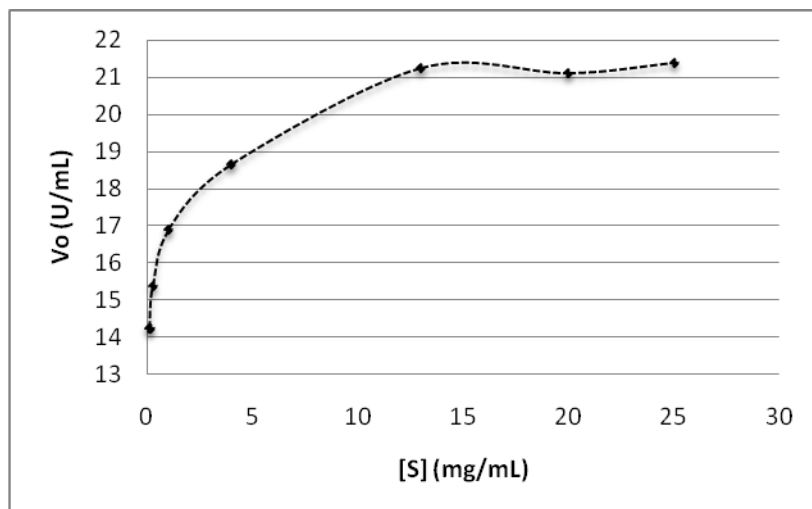


Figura 12 – Gráfico para estudo de K_m e $V_{\text{máx}}$.

O K_m e $V_{\text{máx}}$ aparente foram testados experimentalmente, com o aumento gradativo na concentração do substrato (Figura 12). Obteve-se K_m de 0,04 mg/mL e $V_{\text{máx}}$ de 20,0 $\mu\text{mol/min}$. Como o K_m é uma constante que mede afinidade da enzima pelo substrato, pode-se considerar que o K_m possui alta afinidade pelo seu substrato, quando em valores baixos. A Velocidade máxima mensurada é aquela máxima a qual a enzima pode ter de atividade. Assim, a $V_{\text{máx}}$ obtida foi: 20,0 $\mu\text{mol/min}$.

Germano et al (2002) obteve k_m aparente (extrato bruto) de 2,6 mg/ml, que quando comparado ao obtido no presente estudo, mostra uma afinidade pelo substrato muito inferior. Segundo Mendonça (2011), os valores de $K_{m_{\text{app}}}$ e $V_{máx_{\text{app}}}$ foram, respectivamente, 0,6398 mM e 42,556 nMs^{-1} pra fração solúvel de cisteína protease, o valor de K_m obtido por Mendonça (2011) foi bastante próximo ao obtido neste estudo, apresentando afinidades semelhantes. Em enzima purificada, Merheb et al (2007) obteve k_m de 0,02 mM, e velocidade máxima de 0,14 mM/min, também muito próximo ao obtido neste estudo.

4.3.6 EFEITO DE SUBSTÂNCIAS NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Foram submetidas diferentes substâncias, a saber: PMSF, DTT, EDTA, Leupeptina, MgCl_2 , ZnCl_2 e MnSO_4 , a concentração de 1mM, a meio reacional. Observou-se atividade de $28,69 \pm 0,04$ U/mL quando havia PMSF no meio, $30,69 \pm 0,47$ U/mL quando havia DTT, $28,39 \pm 0,86$ U/mL quando havia EDTA, $30,19 \pm 0,75$ U/mL quando havia Leupeptina, $28,50 \pm 1,18$ /mL quando havia MgCl_2 , $28,47 \pm 0,90$ U/mL quando havia ZnCl_2 , $55,03 \pm 0,82$ U/mL quando havia MnSO_4 (figura 12).

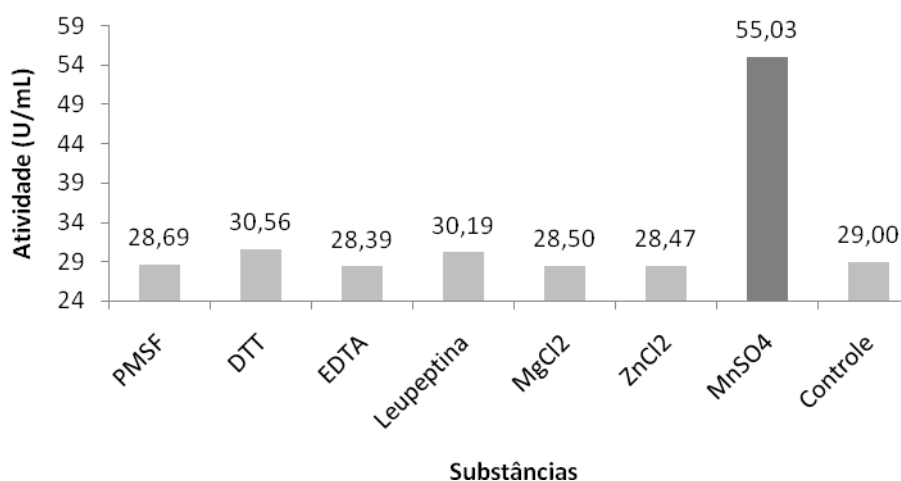


Figura 12 – Influência de substâncias na atividade proteolítica.

Quando comparadas ao controle do experimento, o qual não continha nenhuma substância, sendo a quantificação enzimática procedida com parâmetros definidos como ótimos anteriormente, observou-se grande atividade enzimática na presença de tais substâncias, como pode ser observado na figura 13.

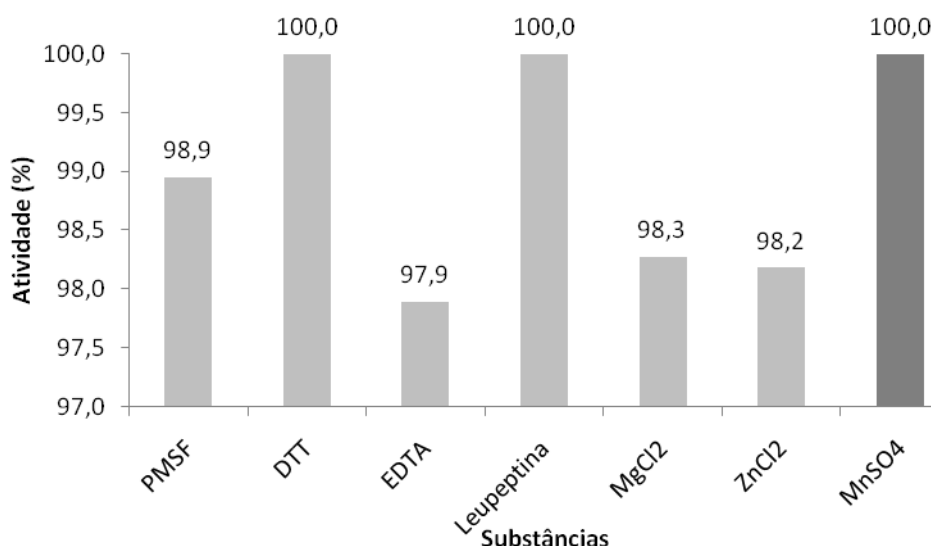


Figura 13 – Influência de substâncias na atividade proteolítica, comparada ao controle, em porcentagem.

PMSF, DTT, EDTA, Leupeptina, MgCl₂, e ZnCl₂ mostraram atividade residual de 100% ou bastante próximo a isso (Figura 13). Destaque para a atividade proteolítica na presença de MnSO₄, pois observou-se um aumento de 76% em sua atividade enzimática, que foi superior ao que Nascimento et al (2006) obteve: 45% a mais da atividade enzimática quando a reação proteolítica foi realizada durante 2 horas, a 60°C na presença MnSO₄.

A atividade enzimática caiu muito levemente na presença de Ácido etileno diamino tetracético (EDTA). Se a queda na atividade fosse mais acentuada, demonstraria a necessidade de íons metálicos para a atividade dessa enzima, mas como a queda foi pouca, pode ser entendido como sendo independente a atividade enzimática de tais íons. Mendonça et al (2011) obteve atividade aumentada pela adição de EDTA em fração solúvel, e na insolúvel, a atividade foi reduzida quando levou adição de EDTA, demonstrando a necessidade de íon metálicos para a atividade dessas enzimas.

PMSF apresentou pequena queda de 1,1% na atividade enzimática, o que mostra a ausência de serino-proteinases. Liu et al (2007) obteve, redução de 75,98% na atividade proteolítica alcalina, indicando a presença de serino-proteases.

4.3.7 PERFIL PROTEICO POR TÉCNICA DE ELETROFORESE

O perfil protéico foi analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), amplamente utilizada para análise de proteínas em uma mistura complexa, pois permite a separação dos componentes da mistura de acordo com seu peso molecular. Após a separação eletroforética, a coloração por prata foi realizada. No estudo, foram separados proteínas de peso molecular, o qual pode ser observado na figura 14 de aproximadamente: 35 kDa, 25 kDa e 14kDa. Foram calculados o Rf de cada proteína observada, o que leva em consideração a distância percorrida pela molécula e a distância percorrida pela linha de frente. Obteve para a proteína de 35kD um Rf de 0,44, para a proteína de 25kDa um Rf de 0,67 e para a proteína de 14kDa, Rf de 1. Uma fração de fraca intensidade também foi observado próximo a 50kDa.

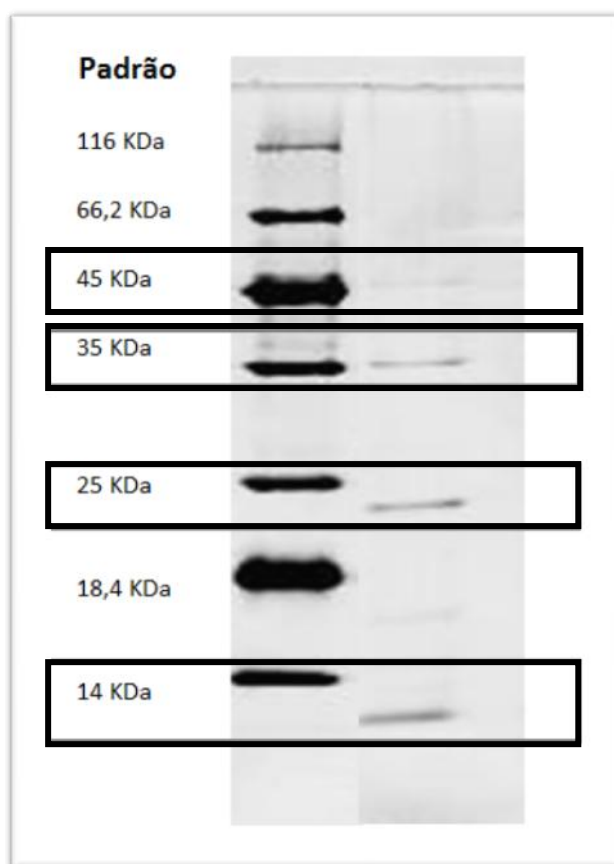


Figura 14 – Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE: Perfil protéico.

Santos (2004) observou a massa molecular da protease purificada estimada em 55 KDa por cromatografia em gel de filtração Sephacryl S-200. Isso indica que a fração de fraca intensidade observado no complexo enzimático pode representar enzimas proteolíticas. No entanto, a

afirmação é de difícil certeza visto que a é vasta a variedade de enzimas proteolíticas. Pode-se observar na tabela 16 o perfil de peso molecular de proteases em diferentes estudos.

Tabela 16 – Peso molecular relacionado com diferentes proteases e origens.

Proteases	Organismos	Peso molecular (kDa)	Referências
Aspártico protease	Fungos	30 - 45	SIELECKI et al., 1991
Cisteína protease	Procariotos e eucariotos	Específico por sub-grupos	BARRET, 1994
Metalo protease	Eucariotos, bactérias e fungos	48 - 60	SHANNON et al., 1989
Serina alcalina	Bactérias, leveduras e fungos	15 - 30	BOGUSLAWSKI et al., 1983
Serina protease	Eucariotos, vírus e bactérias	18 - 35 126 (<i>B. trispora</i>)	BARRET, 1994 GOVIND, 1981
Subtilisina	Bactérias (<i>Bacillus</i>)	27,5	PHADATARE et al., 1993

5. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Pode-se detectar através dos estudos realizados que o melhor substrato para a dosagem enzimática da atividade proteolítica do complexo produzido pelo fungo filamentosso designado F7, isolado do solo amazônico, foi a caseína, com pico de atividade de $7,129 \pm 0,4$ U/mL e $1,893$ U/mg de proteína em fermentação líquida. A melhor fonte de carbono observada dentre as estudadas foi castanha-do-Brasil, e o melhor método fermentativo observado, dentre o líquido (estacionário e agitado) e semi-sólido, foi o semi-sólido, com pico de atividade proteolítica de $17,018 \pm 1,7$ U/mL e atividade específica de $2,472$ U/mg de proteína com 72 horas de cultivo, a temperatura ambiente, sem agitação, ou sem adição de outra substância a não ser a solução de esporos e o resíduo agroindustrial da castanha-do-Brasil.

Quando otimizada a produção do complexo enzimático, obteve-se o pH 9,0 como melhor para produção de enzimas proteolíticas com pico de atividade de $2,510 \pm 0,44$ U/mL e $29,860$ U/mg de proteína, no entanto, este não superou a fermentação semi-sólida em termos de atividade enzimática. Quando otimizada a produção em relação a temperatura, foi observado 22°C como melhor temperatura para fermentação líquida estacionária, com pico de $6,990 \pm 0,66$ U/mL e atividade específica de $32,989$ U/mg de proteína, assim como 40°C para fermentação semi-sólida com pico de atividade de $13,111 \pm 0,36$ U/mL e $33,565$ U/mg de proteína. Definiu-se assim, que a melhor produção de proteases foi a 40°C , em fermentação semi-sólida, sem agitação. A caracterização do complexo enzimático foi realizado em complexos enzimáticos produzido dentre tais parâmetros.

Na caracterização parcial do complexo enzimático observou-se que pH ótimo na dosagem enzimática foi de 8,0 e a melhor estabilidade do pH em tampão McIlvaine pH 8,5. A temperatura ótima foi de 36°C , e o extrato mostrou-se estável entre $36-75^{\circ}\text{C}$ (100% de atividade residual). O $K_{m_{app}}$ foi de $0,04\text{mg/mL}$ e $V_{máx_{app}}$ $20,0 \mu\text{mol/min}$. Quando adicionado PMSF, 98,9% da atividade proteolítica foi mantida, assim como 100% em DTT, 97,9% em EDTA, 100% em Leupeptina, 98,3% em MgCl_2 , 98,2% em ZnCl_2 e 100% em MnSO_4 . A atividade específica foi de $64,303$ U/mg de proteína, depois de otimizadas as condições anteriormente descritas. O perfil protéico analisado eletroforicamente mostrou 3 complexos protéicos bem definidos: 35kDa, 25kDa e 14kDa, indicando a presença de outras proteínas que podem ter aplicação industrial.

Os resultados obtidos mostram que o fungo filamentosso designado F7 é um bom produtor de enzimas proteolíticas, que quando combinada a mais estudos, pode tornar viável a aplicação industrial, principalmente por conta das características bioquímicas do complexo observadas como bastante estáveis.

6. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Tabela 16 – Cronograma de atividades proposto

Descrição	Ago 2010	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2011	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
Revisão de Literatura.	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Tratamento da matéria-prima.		R										
Adaptação da metodologia.		R										
Seleção do método de fermentação a ser utilizado para a produção de cada enzima com resíduo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono.		R	R	R								
Seleção do método de fermentação a ser utilizado para a produção de cada enzima com óleo de andiroba como fonte de carbono.					R	R	R					
*Mudança do projeto. Otimização da produção das enzimas proteases, avaliar pH e temperatura								R	R			
Avaliar influência do pH, temperatura, estabilidade de pH e térmica, Km e $V_{máx}$, efeito de íons e inibidores na atividade enzimática.									R	R	R	
Análise de dados	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Preparação do relatório e apresentação final.											R	R

Onde: R = Realizado

7. REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, V. F.; PETRY, A. C.; ECHEVERRIA, R. M.; FERNANDES, E. C.; JR, F. P. Produção não-madeira e desenvolvimento Sustentável na Amazônia. 2007. Instituto de Química. Laboratório de Tecnologia Química – LATEQ. Universidade de Brasília. Brasília, Brasil.
- BARRET, A.J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. *Methods in Enzymology*, v. 17, p. 136-139, 1995.
- BIOTECHNOLOGICAL PERSPECTIVE. *Process Biochemistry*. Jan. 2003. p. 1- Disponível em <<http://www.sciencedirect.com>> Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2000. 240p.il.
- BOGUSLAWSKI, G.; SHULTZ, J. L.; YEHLE, C. O. Purification and characterization of na extracellular protease from *Flavobacterium arborescens*. *Analytical Biochemistry*, 132:41-49, 1983.
- CASTILLO-YAÑEZ, J. F.; Pacheco-Aguilar, R.; GARCIA-CARREÑO, F. L.; NAVARRETE-DEL TORO, M. A. Characterization of acidic proteolytic enzymes from Monterey sardine (*Sardinops sagax caerulea*) viscera. *Food Chemistry* 85 343–350. Hermosillo, Sonora, Mexico. 2004.
- COELHO, M. A. Z. C.; LEITE, S. G. F. L.; ROSA, M. F. R.; FURTADO, A. A. L. *Aproveitamento de resíduos agroindustriais: Produção de enzimas a partir da casca de coco verde*. B.CEPPA, Curitiba, jan./jun, 2001. 19v, n. 1.
- COOPERATIVA AGRO-EXTRATIVISTA DE XAPURI-AC. *Castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa, H. B.K.)*. Rio Branco [s.n.], 2000.
- COUTO, S. R.; SANROMÁN, M.A. *Application of solid-state fermentation to food industry – A review*. *J. Food Eng.*, 2006. 76(3):291-302.
- DEMAJORIVIC, J. *Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades*. *Revista de Adm. De Empresas*, 1995. 35 (3), 88-93p.
- EDURADO, R.; GRAMINHO; CABRAL H. Caracterização bioquímica da protease parcialmente purificada produzida pelo fungo *Penicillium waksmanii*. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, São Paulo.
- FERRER, M. *Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables*. Sociedad Española de Microbiología Actualidad. SEM, 2004. 38: 11-17p.
- GARCÍA-CARREÑO, F. L., DIMES, L. E., e HAARD, N. F. (1993). Substrate- gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteases or proteinaceous protease inhibitors. *Analytical Biochemistry*, 214, 65–69.
- GARCÍA-CARREÑO, F. L.; HAARD, N. F. (1993). Characterization of protease classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. *J. Food Biochem.*, 17, 97–113.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; Soccol, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* 32 (2003) 246–251. 2002.

GOVIND, N. S.; MEHTA, B.; SHARMA, M.; MODI, V. V. Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora*. *Phytochemistry*, 20:2483-2485, 1981.

HARTMEIER, W. *Immobilized biocatalysts: an introduction*. Berlin: Springer Verlag, 1988.

ILLANES, A. *Biotecnologia de enzimas*. Valparaiso: Editora de la Universidad Catolica de Valparaiso, 1994.

KRISHNA, C. *Solid-state fermentation systems – an overview*. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2005. 25 (1-2):1-30p.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. *Biotechnol Adv.* v.17, p. 561–94, 1999.

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

LAUFENBERG, G. *Transformation of vegetable waste into added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations*. *Bioresource Technology*, 2003. 167-198p.

LEADLAY, P.F.; BAERGA-ORTIZ, A. (2003). Mammalian fatty acid synthase: closure on a textbook mechanism? *Chem. Biol.*, 10, 101-103.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A.. "The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*". *J. Mol. Biol.*, v. 76, p. 103 – 122, 1973.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. 1 ed. Ed. Edgard Blücher Ltda, 2001. 3v.

LIU, Z. Y.; WANG, Z.; XU, S. Y.; XU, L.N. WANG Partial characterization and activity distribution of proteases along the intestine of Grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Val.). Food Science Institute of Southern Yangtze University e Key Laboratory of Food Science and Safety of Ministry of Education, Wuxi, Jiangsu. Departamento de tecnologia de comida e biológicos, Universidade XiangTan. XiangTan, HuNan, China. 2007.

MENDONÇA, E. G.; VISÔTOO, E. L.; COSTA, N. C. S.; RIBEIRO, F. R.; OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A. Caracterização enzimática de isoformas de cisteína protease de *Anticarsia gemmatilis* (HÜBNER, 1818). *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 35, n. 3, p. 446-454, maio/jun., 2011.

MERHEB, C.; CABRAL, H.; GOMES, E.; SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, v. 104, p. 127-131, 2007.

MUDGETT, R.E. Solid State Fermentation In: DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Washington: American Society for Microbiology, 1986. 66-84p.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. STUDIES ON THE STABILITY OF PROTEASE FROM *BACILL*. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil Brazilian Journal of Microbiology (2006) 37:307-311.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lenhinger: Princípios de Bioquímica. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2007.

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. VOL. 36(3) 2006: 299 – 306.

NORDISK S. A. *Biotimes*. [S.l.], 1996.

ORIOLE, E. *Croissance d'Aspergillus niger sur Milieu Solide: Importance de Léau et de l'Activité de Léau*. Thèse de Doctorat Microbiologie, INSA Toulouse, 27 Juin 1987, 113p.

PACHECO, A. M.; VILDES, M. S. Castanha-do-Brasil – da floresta tropical ao consumidor. 2006. Florianópolis, SC: Editorgraf. 176p.: il.; 21cm Brasil.

PAIVA, F. C.; SILVA, L. A. O. Seleção de Fungos Filamentosos Isolados do Solo no Campus da Ufam Produtores de Enzimas Hidrolíticas. RELATÓRIO FINAL – PIBIC. PIB – B/0002/2008. Manaus, AM, 2008.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. High activit alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 72-76, 1993.

PORTO, M. V. C. P. Cadeia Agroindustrial do Leite e Derivados. Curso Técnico Subseqüente em Agroindústria. Ministério da educação. Secretaria da educação profissional e tecnológica. Instituto federal de educação, ciência e tecnologia – Tocantins. Campus de paraíso do Tocantins. 2011.

PRIEST, F.G. *Extracellular enzymes*. Londres: Van Nostrand Reinhold, 1984.

SANTOS, E. P. *Uso de enzimas em cosméticos*. VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática – Enzitec, Rio de Janeiro, 2004.

SGARBIERI, V.C. (1996). *Caseínas em alimentos protéicos: propriedades – Degradações – Modificações*. Editora Varela (São Paulo), 516p.

SHANNON, J. D.; BARAMOVA, E. N.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Amino acid sequence of *Crotalus atrox* venom metalloprotease which cleaves type IV collagen and gelatin. *Journal of Biological Chemistry*, 264:11575-11583, 1989.

SIELECKI, A. R.; FUJINAGA, M.; READ, R. J.; JAMES, M. N. G. Refined structure of porcine pepsinogen at 1.8^a resolution. *Journal of Molecular Biology*, 219:671, 1991.

SILVA, G. A. B.; ALMEIDA, W. E. S.; CORTES, M. S.; MARTINS E. S. Produção e caracterização de protease obtida por *gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Frutal – MG / Brasil. 2009.

SIMÕES, S.I. *Veiculação transdérmica de fármacos: III*. Produtores de transporte transdérmico de fármacos. Ver. Bras. Clin. Terap., 2001. 27(6):257-74p.

SOCOL, C.R. *Physiologie et Métabolisme de Rhizopus en Culture Solide et Submergée en Relation Avec la Dégradation d'Amidon et la Production d'Acide L(+) Lactique*. Thèse de Doctorat. Mention Génie enzymatique, Bioconversion ET Microbiologie, Université de Technologie de Compiègne. Compiègne-France, 1992. 218 p.

SOUZA, M. L. *Estudo de processos tecnológicos para a obtenção de produtos derivados da castanha-do-Brasil (Bertholletia excelsa, H.B.K.)*. Fortaleza, 1984. 139 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Universidade Federal do Ceará.

SOUZA, M.; MENEZES, H. Processamento de amêndoa e torta de Castanha do Brasil e Farinha de Mandioca: parâmetros de qualidade. Ciência e tecnologia de Alimentos. V. 24. N. 01, Campinas Jan/Mar. 2004.

TEIXEIRA, E. *Frutas do Brasil*. Rio de Janeiro: MEC/ INL, 1954. 281p.

TIAGOI, P. V.; SILVAI, R. J. Atividade proteolítica de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre substratos cuticulares e não-cuticulares. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Tangará da Serra, MT, Brasil Ciência Rural, v.37, n.1, jan-fev, 2007.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 2 ed. Londres: John Wiley e Sons, 1995.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). Microb. Genet. Bull., Columbus, v. 13, p. 42-43, 1956.