UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

# Avaliação das Condições de Fermentação Semi-Sólida na Produção de Protease Coagulantes por *Aspergillus flavo-furcatis*(Batista & Maia 1956)

MEIRE ROSSY OLIVEIRA DA CRUZ

Manaus, Amazonas
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

# Avaliação das Condições de Fermentação Semi-Sólida na Produção de Protease Coagulantes por *Aspergillus flavo-furcatis*(Batista & Maia 1956)

MEIRE ROSSY OLIVEIRA DA CRUZ
ORIENTADORA: Drª MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Diversidade Biológica área de concentração em Biotecnologia do Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, Amazonas

2012

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C957a

Cruz, Meire Rossy Oliveira da
Avaliação das Condições de Fermentação Semi-Sólida na Produção de Protease Coagulantes por Aspergillus flavo-furcatis(Batista & Maia 1956) / Meire Rossy Oliveira da Cruz, Maria Francisca Simas Teixeira. 2012
16 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Francisca Simas Teixeira
Tese (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federaldo Amazonas.

1. protease coagulante. 2. Aspergillus flavo-furcatis. 3. fermentação semi -sólida.. 4. coagulante. I. Teixeira, Maria Francisca Simas. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Aos meus pais Paulo Rocy e Jane Cruz, fontes de toda força e vontade que carrego comigo aodespertar de cada manhã. Ao meu noivo Júnior, por todo apoio, amor e compreensão.

**DEDICO**

**AGRADECIMENTOS**

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, e a nossa senhora minha intercessora.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha orientadora professora e doutora Maria Francisca Simas Teixeira, por acreditar em mim, me mostrar o caminho da ciência e ser exemplo de profissional.

As colegas de laboratório Rosana Palheta, Aila Raiane, Jessica Barroncas, Larrisa Krisci, Taciana Amorin e Tamiris Fonseca e que fizeram parte desses momentos sempre me ajudando e incentivando.

À FAPEAM pelo incentivo ao desenvolvimento deste trabalho através da concessão de uma bolsa de mestrado.

A todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração deste trabalho.

**RESUMO**

Treze linhagens de *Aspergillus flavo- furcatis* foram submetidas à fermentação no estado semi-sólido de residuos agroindustriais amazônicos, semente de açaí e casca de cupuaçu, suplementados com farelo de arroz, a 25 ºC em 5 dias. A atividade proteolítica foi realizada utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato nos tampões em condições padronizadas. Em 100% dos extratos foi determinada a atividade das enzimas. As linhagens de *A. flavo-furcatis* expressaram atividade proteolítica nos dois resíduos agroflorestais. Em semente de açaí suplementado com farelo de arroz a média da atividade proteolítica foi 46,32% superior da determinada em cupuaçu e farelo de arroz (465,50 U/mL). Entre os *Aspergillus* avaliados, a atividade de valor significativo de protease (929,2 U/mL) foi expressa por *A. flavo-furcatis* DPUA 1608 quando no bioprocesso foi utilizado semente de açaí. Em casca de cupuaçu, *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1539 foi o que expressou maior atividade (619,77 U/mL).As condições de cultivo que proporcionaram aumento expressivo na atividade proteolítica foram inóculo com 10 dias de cultivo, a fermentação em cinco dias. As linhagens de *A. flavo-furcatis* são fontes promissoras de proteases para futura aplicação industrial quando cultivados n o resíduos agroflorestais amazônicos estudado.

**Palavras-chave:** protease coagulante, *Aspergillus flavo-furcatis,* fermentação semi-sólida.

## ABSTRACT

Thirteen strains of Aspergillus flavofurcatis were subjected to semi-solid fermentation of Amazonian agro-industrial waste, açaí seed and cupuaçu peel, supplemented with rice bran, at 25 ºC in 5 days. Proteolytic activity was performed using 1% (w/v) azocasein as substrate in buffers under standardized conditions. The enzyme activity was determined in 100% of the extracts. The A. flavo-furcatis strains expressed proteolytic activity in both agroforestry residues. In açaí seeds supplemented with rice bran, the average proteolytic activity was 46.32% higher than that determined in cupuaçu and rice bran (465.50 U/mL). Among the Aspergillus evaluated, a significant protease activity (929.2 U/mL) was expressed by A. flavo-furcatis DPUA 1608 when açaí seed was used in the bioprocess. In cupuaçu peel, Aspergillus flavo-furcatis DPUA 1539 was the one that expressed the highest activity (619.77 U/mL). The cultivation conditions that provided a significant increase in proteolytic activity were inoculum with 10 days of cultivation, fermentation in five days . A. flavo-furcatis strains are promising sources of proteases for future industrial application when cultivated in the Amazonian agroforestry residue studied.

**Keywords:** coagulant protease, Aspergillus flavo-furcatis, semi-solid fermentation.

**SUMÁRIO**

**Capítulo 01** ..... **9**

***Revisão bibliográfica e Material e métodos*** ..... ***9***

**1. INTRODUÇÃO** ..... **10**

**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... **11**

**2.1 Proteases coagulantes** ..... **11**

**2.2 Fungos como fonte de proteases** ..... **16**

***2.2.1 Aspergillus flavo-furcatis*** ..... ***16***

**2.3 Fermentação em meio semi-sólido** ..... **17**

**2.3.1Resíduos utilizados em fermentação semi-sólida** ..... **19**

**3 OBJETIVO GERAL** ..... **21**

**Objetivos Específicos** ..... **21**

**4. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **22**

**4.1.Micro-organismos** ..... **22**

**4.2. Cultivo monospórico e autenticação** ..... **22**

**4.3. Produção das proteases** ..... **22**

**4.3.1.Preparação dos resíduos** ..... **22**

**4.3.2.Fermentação semi-sólida (FSS)** ..... **22**

**4.3.3. Extração das proteases** ..... **22**

**4.3.4. Determinação da atividade de proteases** ..... **23**

**4.4. Efeito de diferentes parâmetros na atividade de protease utilizando um planejamento fatorial** ..... **23**

**4.5. Efeito do pH das proteases** ..... **23**

**4.6. Efeito da temperatura na atividade das proteases** ..... **23**

**4.7. Bioensaio de toxicidade utilizando *A. salina* da espécie selecionada** ..... **24**

**5. ANÁLISE ESTATÍSTICA** ..... **25**

**Capítulo 02** ..... **26**

**Artigo a ser submetido** ..... **26**
AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROFLORESTAIS AMAZÔNICOS E O SEU EFEITO A PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus flavo-furcatis* ..... **27**

**Depósito de Pedido de Patente** ..... **39**

**6. CONCLUSÃO GERAL** ..... **42**

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **43**

# Capítulo 01

*Revisão bibliográfica e Material e métodos*

# 1. INTRODUÇÃO

Os *Aspergillus* são fungos filamentosos anamorfos, com aproximadamente 150 espécies que ocorrem numa variedade de habitats e comumente no solo, em alimentos armazenados, produtos agrícolas, fragmento vegetal em decomposição, em região tropical e subtropical (Klich; Pitt,1998; Samson et al., 2007).

Nas últimas décadas, espécies de *Aspergillus* têm despertado interesse para aplicação em processos industriais, com predominância como fonte de enzimas para indústria de alimentos e detergentes. Inserido nesse grupo estão *A. niger, A. oryzae, A. terreus* e *A. clavatus* (Chakrabrati et al., 2000;Reddy et al., 2003).

Do grupo de enzimas disponíveis comercialmente, as proteases predominam nesse mercado, somam cerca de 60% do total de biocatalisadores comercializados mundialmente, cuja fonte são vegetais, fungos e bactérias, porém somente parte desses seres vivos produz proteases que expressam alta atividade enzimática com sucesso comercial (Gupta et al., 2008).

O expressivo valor econômico das proteases e a importância desses biocatalisadores no processamento de alimentos e bebidas, nas indústrias de papel, detergentes, têxteis, na formulação de medicamentos e na fabricação de queijos são os fatores essenciais que contribuem para busca de proteases com novas propriedades.

Nos processos industriais ou em escala laboratorial, enzimas hidrolíticas extracelulares, como as proteases são produzidas por fermentação em meio líquido ou em matriz sólida (Gupta et al., 2008). Nessas perspectivas entre os resíduos disponíveis nos diferentes ecossistemas, aqueles provenientes da indústria de alimentos envolvem quantidades apreciáveis de casca, caroço e outros que, além de ser fonte de matéria orgânica são fonte de proteínas, enzimas e óleos essenciais, passíveis de recuperação e aproveitamento (Coelho et al., 2001).

A economia brasileira é uma das mais importantes economias de base agrícolas do mundo, onde destacam-se a produção do café, de cana-de-açúcar, da soja e a fruticultura (Menezes, 2006). Nos últimos anos, especial atenção vem sendo dada a alternativa que conduzam à minimização ou ao reaproveitamento dos resíduos sólidos gerados nos diferentes processos industriais. A indústria alimentícia, especialmente a indústria de sucos, gera uma enorme quantidade de resíduos provenientes das frutas, obtendo-se ao final do processo quantidades apreciáveis de casca, caroço e sementes. Quanto a esses produtos oriundos de frutos, a porção descartada pode corresponder a um conteúdo elevado, a exemplo da manga (30-50%), banana (20%), abacaxi (40-50%) e laranja (30-50%), condição que se apresenta como um grave problema de destino final de resíduos que podem conduzir a outras conseqüências se não adequadamente gerenciados (Canteri et al., 2008).

A fruticultura regional também gera considerável volume de resíduos, destacando-se o cultivo do cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) e o açaí (*Euterpe oleracea)* fruto muito apreciado pela população amazônica e consumido na forma de sucos, doces, geléias

etc. A casca desse fruto quando descartada no ambiente se torna substrato para microrganismos oportunistas, proporcionando até o crescimento de fitopatógenos. Atualmente parte desse resíduo vem sendo utilizados em experimentos desenvolvimento no laboratório de micologia da UFAM.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Proteases coagulantes

Vários microrganismos são fontes de protease como as bactérias, protozoários, leveduras e fungos filamentosos podendo ser extracelulares ou intracelulares, ligados ou não à membrana. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Microrganismos representam uma excelente diversidade fonte de proteases devido à sua grande bioquímica, permitindo que o rendimento das enzimas proteolíticas por fermentação possa ser incrementado através de manipulação genética e melhoramento das condições de cultivo (Neurath,1995; Said&Pietro,2002).

As proteases são classificadas, segundo a Enzyme Comission (EC), dentro do grupo das hidrolases, enzimas que quebram o substrato com a introdução de uma molécula de água. Essas enzimas constituem um amplo e complexo grupo de enzimas, diferindo-se em propriedades como substrato específico, sítio de ação e mecanismo catalítico, pH e temperatura ótima e perfil de estabilidade (Sumantha *et al.* 2006).

Quanto ao mecanismo de ação, as enzimas proteolíticas são subdivididas em 2 grupos: exoproteases, aquelas que clivam ligações peptídicas próximas às extremidades da cadeia polipeptídica e, endoproteases, as que atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica (Monod *et al*. 2002).

As exopeptidases dividem-se ainda em: carboxipeptidase que rompem as ligações a partir da extremidade C-terminal, e as aminopeptidases que rompem as ligações a partir das extremidades N-terminal. As endopeptidases são divididas em quatro subgrupos baseados em seus mecanismos catalíticos: serina protease, aspártico protease, cisteína protease e metaloproteases.(Rao 1998).

As proteases também podem ser classificadas em ácidas, neutras e alcalinas (Sandhya 2004). Desta forma as proteases ácidas são aquelas que expressam pH ótimo na faixa ótima de pH 2,0 - 4,0, são produzidas por fungos e têm aplicação na fabricação de queijo, amaciamento de carne, na produção de alimentos fermentados e também em limpeza de compostos ácidos (Rao e Narasu 2007; Thys 2004). Já as proteases neutras são importantes para indústria alimentícia porque elas possuem uma função específica em hidrolisar ligações hidrofóbicas de aminoácidos em pH neutro, reduzindo o amargor de alimentos protéicos hidrolisados (Sandhya, 2005). Proteases neutras produzidas por fungos são importante em aplicações nas indústrias de panificação, processamento de

alimentos, modificação de proteínas, tratamento de couro, alimentos para animais e na indústria farmacêutica (Sumantha *et al*. 2006). Enquanto as proteases alcalinas podem ser obtidas de diferentes fontes como bactérias, fungos e certos insetos. Elas são classificadas dentro do grupo das serino protease e são um importante grupo de enzimas utilizadas principalmente na formulação de detergentes em pó, ajudando na remoção de manchas de origem protéica (Kumar 1999; Moreira *et al*. 2003; Espósito 2006; Rao e Narasu 2007).

As enzimas proteolíticas representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais que são responsáveis por cerca de 60% da venda total mundial de enzimas (Djamel *et al.* 2009) . Elas apresentam uma ampla variedade de aplicações nas indústrias de detergente, alimentícia, farmacêutica, de diagnósticos, na indústria química (Monteiro *et al*. 2003) na produção de queijo, iogurte, cerveja e molho de soja (Nishiwaki 2009). Em panificação, processamento de carnes, conservas e peixes (Bon e Pereira 1999).

Na indústria de laticínios, as proteases são utilizadas na fabricação de queijo, pois um grande número de enzimas proteolítica coagula o complexo caseínico do leite. No processo de fabricação deste produto essas enzimas hidrolisam a ligação peptídica Fenilalanina$_{105}$ –Metinonina$_{106}$ para gerar κ-caseína e macropeptídeos. (Duarte et al. 2009).

Os elementos protéicos do leite podem ser classificados em proteínas do soro (albumina do soro - BSA, α-lactoalbumina, β-lactoglobulina, imunoglobulina -Ig e proteose-peptonas) e as caseínas ($\alpha_1$,$\alpha_2$, β, γ e κ) (Rezer, 2010).

As proteínas do soro representa a parte aquosa do leite ou soro derivado da separação do coágulo que resulta da precipitação das proteínas do leite por enzimas proteolíticas ou ácidas. De acordo com Balbis et al. (2009), as proteínas do soro contêm uma maior concentração dos aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina. Estes aminoácidos, particularmente a leucina, são factores importantes no crescimento e reparação dos tecidos.

Alguns estudos clínicos com roedores sugerem que as proteínas do soro podem influenciar na produção de glutatião, possuindo assim propriedades anti- flamátorias e anticancerígenas (Hakkak et al., 2001; Xiao et al., 2006).. Além do que as proteínas do soro podem ser de grande interesse para a saúde humana, pois podem representar fórmulas nutricionais simples para prevenção de problemas cardíacos ou suplementação para diversas doenças (Krissansen, 2007).

As caseínas, componentes protéicos mais importantes do leite, fonte primordial de cálcio, fosfato e aminoácidos necessários para o crescimento e energia de todos os mamíferos. As caseínas são moléculas relativamente pequena, apresentando uma elevada hidrofobicidade ($\beta > \kappa > \alpha_{S1} > \alpha_{S2}$) e distribuição irregular da carga e polaridade dos seus aminoácidos (Fox, 1989).

A caseína é uma fosfoproteína sintetizada nas células epitelias da glândula mamária e secreta na forma de micela.

Segundo Medeiros (2010) as caseínas α possuem especificidades comuns como a presença de agrupamentos de fósforo sob a forma de fosfosseril, a forte proporção de

resíduos apolares e o elevado teor de certos aminoácidos, tais como ácido glutâmico, leucina e prolina. Diferenciam-se entre si pelo número de grupos fosfosseril pela presença ou não de cisteína e glúcidos e pelo seu caráter mais ou menos hidrófobo.

Em se tratando das caseínas $\alpha_s$ e β que apresentam alto grau de fosforilação, nota-se um grupamento dos grupos fosfosseril, ocasionando a criação, na cadeia peptídica, de áreas com caráter ácido e hidrófilo muito contundente. Estas aglomeração de cargas negativas destinam-se a estas caseínas uma das suas mais elementares propriedades: a capacidade de fixação de cálcio (Medeiros, 2010).

Diferente das outras proteínas a caseína κ apresenta solubilidade na presença do íon de cálcio, possui glúcidos na cadeia peptídica e tem uma elevada sensibilidade à ação da quimiosina à escala da ligação Fenilalanina-Metionina (105-106).

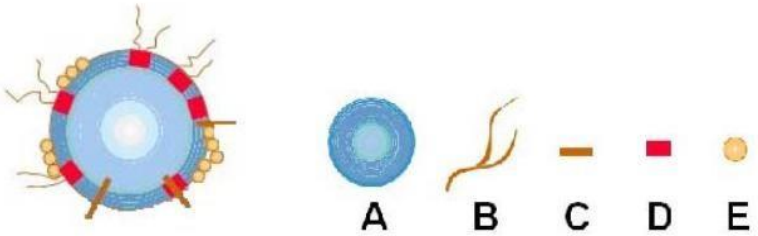
A caseína κ é uma glicoproteína de cadeia peptídica singular, tem estrutura primária apresentando duas regiões: a componente NH2-terminal (1-105) dotada de um caráter básico e hidrófobo, configurando um poder estabilizador, enquanto que a componentes COOH-terminal (106-169) é ácida e hidrófila. Possuindo o poder de formar, conjuntamente com as outras caseínas, complexos estáveis na presença de cálcio (Medeiros, 2010).

No leite, cada caseína esta integrada numa estrutura maior – a micela de caseína. Esta estrutura consiste em uma partícula esférica, de diâmetro entre 30 a 300 nm, (Figura 1) constituída por cerca de 80-90% de toda caseína presente no leite bovino de componentes salinos, essencialmente cálcio e fosfato (Tabela 1) (Medeiros, 2010).

**Tabela 1. Composição média da micela de caseína (em g/100 g). Fonte: Medeiros, 2003.**

| CASEÍNAS | | COMPONENTES SALINOS | |
|---|---|---|---|
| $\alpha_{s1}$ | 33 | Cálcio | 2,9 |
| $\alpha_{s2}$ | 11 | Magnésio | 0,2 |
| B | 33 | Fosfato Inorgânico | 4,3 |
| κ | 11 | Citrato | 0,5 |
| Γ | 4 | - | - |
| **TOTAL** | **92** | **TOTAL** | **8,0** |

A micela está constituída por subunidade (submicelas) de aproximadamente 12 a 15 nm, cada uma contendo entre 20 a 25 moléculas de caseína, unidas por ligações de natureza hidrófoba e ligações eletrostáticas. Presumivelmente, a região hidrófoba desta moléculas encontra-se no núcleo da submicela, enquanto que os componentes polares hidrófilos – os resíduos fosfosseril das caseínas $\alpha_s$ e β e a componente COOH-terminal da caseína κ encontra-se exteriormente à superfície submiceliar (Duarte et al. 2009).




(A – submicela; B – cadeias salientes; C – fosfato de cálcio; D – κ-CN; E – grupos fosfato)

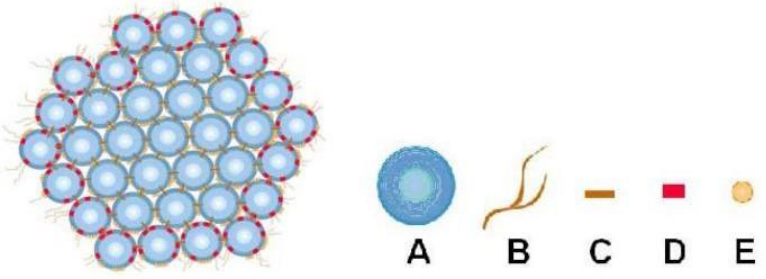
**Figura 1. Micela de caseína (modelo simplista)**
**Fonte: Medeiros, 2010**

A presença de cálcio e fosfato implica uma agregação das submicelas em unidades maiores, as denominadas micelas de caseína. Esta agregação pode ser explanada pelo fato de que a fosfato de cálcio pela submicela (que nesta fase passa a serdenominada fosfato de cálcio coloidal), ameniza a sua carga elétrica, compactando-a. Adimensão do agregado resultante varia consoante o teor de caseína κ que contém baixo poder de fixação de cálcio (Figura 2) (Medeiros, 2010).

As micelas de caseína têm natureza ácida e fixam água em demasiada proporção, fixando, imobilizando, resguardando e estabilizando à superfície micelar, já que forma um envoltório de hidratação.

A estabilidade da micela de caseína também depende da presença de κ-caseína na sua superfície, a qual se constitui na fração hidrofílica da caseína, que reage com a água e impede a agregação das micelas. Segundo Tuinier e Kruif (2002), a estabilidade

estérica gerada pela relativamente esparsa camada externa de caseína κ em forma de escova é o fator estabilizante mais importante.




(A – submicela; B – cadeias salientes; C – fosfato de cálcio; D – κ-CN; E – grupos fosfato)

**Figura 2. Micela de caseína (modelo alternativo).**
**Fonte: Medeiros, 2010.**

A estabilidade acima referida depende em grande proporção de fatores intrínsecos ao leite e seu sistema coloidal. Assim sendo, alguns fatores extrínsecos podem estar na origem da desestabilidade micelar, como acidificação ou a ação de certas enzimas proteolíticas, que atual ao nível da micela e/ou do seu ambiente circundante implicam no fenômeno da coagulação do leite, o qual consiste a base do fabrico do queijo (Medeiros, 2010).

Para obtenção do queijo, a escolha do agente coagulante é fundamental, pois as enzimas coagulantes influenciam na degradação protéica, sendo umas mais proteolíticas que outras (Silva *et al*. 2009).

O agente coagulante convencional utilizado na produção de queijos é extraído, do quarto estômago de bezerros lactentes sendo o mais utilizado na produção do queijo devido expressar alta especificidade pela caseína, denominado coalho. Desta forma a demanda de estomago de bezerro para a extração de coalho é muito elevada, dificultando a produção, devido ao alto custo e a escassez da matéria prima (Van, 2002).

Microrganismos com *Rhizomucor mieheir, R. pusillus, Endothia parasítica, Aspergillus oryzae e Irpex lactics* são extensivamentes usados para a produção de proteinases para uso como coagulantes de leite. Os coagulantes microbianos são atualmente utilizados em cerca de 1/3 de toda a produção mundial do queijo (Van, 2002).

Outro extrato enzimático com poder coagulante do leite já produzido industrialmente é o proveniente do fungo *Aspergillus niger* var. *awamori* (Rao, et al., 1998; Silva, et al., 2009).

Recentemente muitos estudos estão sendo realizados visando a obtenção de extratos de origem fungica que possam substituir o coagulante convencional, como de *Mucor sp.* (Muheshwari et al., 2000; Tubesha & Al-Delaimy, 2003), *Thermomyces lanuginous* (Jensen et al., 2002), *Aspergillus sp.* (Coral et al., 2003; Shata, 2005; Tunga et al., 2003), *Penicillium sp.* (Germano et al., 2003) e *Rhizopus oryzae* (Kumar et al., 2005).

## 2.2 Fungos como fonte de proteases

As enzimas proteolíticas são produzidas por plantas, animais e microrganismos. No entanto, os microrganismos são a fonte preferencial de proteases devido a sua ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade para manipulação genética, além de possuírem características desejadas para aplicações industriais (Sandhya 2004; Ramakrishina *et al*. 2010).

Segundo Weingartner (2010) atualmente sabe-se que as enzimas microbianas são aplicadas na indústria de alimentos de sabão em pó e detergentes na fabrica de papel e tecidos em diversos setores industriais O uso de fungos na dieta e como fonte de bebidas é conhecido desde os tempos antigos. Mas foi a partir de 1960 que houve o aumento do uso de enzimas microbianas na indústria de alimentos (Ghorai *et al*. 2009).

As enzimas produzidas por fungos são mais seguras que aquelas produzidas por bactérias, desde que eles estejam normalmente reconhecidos com GRAS-Generally Regarded As Safe (Germano *et al.* 2003).

Nos recentes anos, o potencial uso de microrganismos como fontes biotecnológicas de enzimas de relevância industrial estimulou o interesse na exploração de atividades enzimáticas em vários microrganismos (Goud 2009).

O isolamento e seleção de novos microrganismos com potencial para a produção de proteases é necessário e, para isso, são feitas técnicas rápidas e sensíveis para detecção e caracterização de proteases microbianas (Saran *et al.* 2007).

### *2.2.1 Aspergillus flavo-furcatis*

Classicamente, *Aspergillus flavo-furcatis* é um dos membros do Grupo flavus, este constituído por *A. flavus, A. flavus var. columnaris, A. parasiticus, A. oryzae, A. oryzae var. effusus, A. zonatus, A. clavato-flavus, A. tamarii, A. subolivaceus and A. avenaceus* (Raper; Fennell, 1977; Hedayati et al., 2007).

Entre esses fungos anamorfos, *A. flavus* e *A. parasiticus* têm sido citado como causadores de patologias humanas e animal, todavia, as demais espécies têm sido exploradas biotecnologicamente em processos de fermentação (Frisvad et al., 2007).

Em relação a *A. flavo-furcatis,* além de não ser causador de patologias (Hedayati et al., 2007; Nascimento; Martins, 2006; Abidi et al., 2008). É uma espécie não estudada quanto à produção de compostos bioativos, a exemplo de proteases para os diversos fins industriais.

Quanto a sua morfologia os *Aspergillus flavo-furcatis* foram descrito pela primeira fez por Batista e Maia (1955), suas colônias possuem uma coloração com escalas variadas de amarelo castanho, quando jovens, a marrom. Micromorfologia, sua cabeça possui conídios irradiados ou dividido em colunas; conidióforo longo e ereto produzido a partir do micélio basal; micélios brancos; vesículas piriformes para subglobosa, serriado, biserriado ou ambos presente na mesma vesícula; métula cobrindo ¾ para toda a superfície da vesícula; conídios globosos a subglobosos ou ovóides na maturidade.

## 2.3 Fermentação em meio semi-sólido

A fermentação em meio semi-sólido é definida como sendo o processo fermentativo no qual o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos ocorrem na superfície do substrato sólido próximo à ausência de água livre. De acordo com Weingartner (2010), a produção de enzimas é realizada por ambos os processos fermentativos: sólido e submerso. Entretanto a fermentação no estado sólido (FES) vem ganhando renovado interesse empregando principalmente espécies fúngicas.

Caracterizar a fermentação semi-sólida, via de regra, leva a uma comparação com a fermentação submersa, para uma melhor compreensão do processo. A fermentação em meio semi-sólida apresenta vantagens sobre a fermentação submersa por ter um custo de produção mais viável, devido à pequena exigência energética e à facilidade na extração dos produtos (Weingartner, 2010).

As condições de cultura do processo de fermentação em meio semi- sólido são mais similares ao habitat natural dos fungos filamentosos do que as condições de fermentação em cultura submersa, de modo que esses microrganismos são capazes de crescer satisfatoriamente no substrato sólido e excretar grandes quantidades de enzimas (Castilho et al., 2000 a; Silva et al., 2009).

Os principais fatores que determinam a eficiência do processo fermentativo bem como a qualidade do produto obtido são a aeração e transferência de oxigênio, temperatura e transferência de calor, atividade de água e umidade e a escolha adequada do microrganismo e do substrato.

O sistema de aeração, na fermentação semi-sólida, é simples desde que o projeto do reator seja apropriado para permitir livre acesso do oxigênio atmosférico até o substrato. O autor especifica ainda que neste tipo de fermentação, forma-se um filme de água sobre o substrato insolúvel, o que torna a difusão do oxigênio para mais rápida do que no processo submerso.

Segundo Silva et al (2009), o controle da temperatura na fermentação semi- sólida, em nível industrial, é um problema de difícil resolução, onde as principais dificuldades na transferência de calor estão relacionadas às características térmicas dos matérias orgânicos e à baixa umidade presente no sistema.

Em fermentação semi-sólida é essencial o controle da temperatura do sistema, na faixa propícia ao crescimento do microrganismo, para possibilitar a eficiência do processo. Temperaturas elevadas afetam a germinação dos esporos, o crescimento celular e a formação de produtos, ao passo que temperaturas muito baixas são desfavoráveis ao crescimento dos microrganismos e a outras reações bioquímicas (Hasan et al., 1998).

Os parâmetros fundamentais para a transferência de massa (água e solutos) através das células microbianas são a atividade de água e a umidade dos substratos sólidos ( Pandey et al., 2000 a).

A natureza do material, o tipo de produto final desejado e a necessidade do microrganismo, determinam o nível de umidade adequado do substrato sólido (Schmidell, 2001). A determinação da quantidade de líquido necessário para a manutenção da umidade do sistema é fundamental para o sucesso é fundamental para o sucesso do processo.

O excesso de líquido no interior da matriz sólida leva a redução da porosidade do leito diminuindo a difusão do oxigênio, ao mesmo tempo em que, propicia um ambiente mais favorável à contaminação bacteriana e à formação de hifas aéreas.

Por outro lado, baixos níveis de umidade no substrato prejudicam o crescimento microbiano, pois comprometem a difusão de nutrientes e de oxigênio, podendo levar a falta de nutrientes e ai acúmulo de metabólitos inibitórios do crescimento (Weingartner, 2010).

O tipo de microrganismo que pode crescer e formar produtos, em fermentação semi-sólida, é determinado, principalmente, pela atividade de água (Aw) do meio. De acordo com Duarte et al (2009) valores de Aw na ordem de 0,95 – 0,98 podem ser considerados típicos para os meios das fermentações semi-sólidas. Este nível de Aw é ideal para o crescimento de muitos fungos, especialmente os filamentosos.

O meio de cultivo para fermentação semi-sólida é simples, na maioria das vezes, natural. São usados substratos comuns, geralmente, resíduos agroindustriais com elevados teores de carboidratos ou proteínas. O único componente necessário, a ser adicionado ao meio é água, embora, ocasionalmente, outros nutrientes como fonte de nitrogênio ou minerais possam se adicionados (Silva, 2009).

O custo e a viabilidade de uso são os fatores primordiais a serem analisados na escolha do substrato mais adequado para a fermentação semi-sólida (Pandey et al., 2000 a), por isso, na maioria das vezes, são utilizados resíduos agroindustriais. A utilização deste tipo de material é vantajosa economicamente, haja visto que o custo do processo é minimizados, já que estes resíduos são sub-produtos das indústrias de alimentos(Castilho et al., 2000b).

A fermentação em meio sólido tem emergido como uma tecnologia apropriada para o manejo de resíduos agroindustriais, agregando a esses valores comerciais e destacando-se como tecnologia promissora para o desenvolvimento de muitos bioprocessos, incluindo a produção em larga escala de enzimas industriais (Nampoothiri et al., 2004).

O Brasil segue a promissora tendência mundial do desenvolvimento de processos de fermentação em meio semi-sólido, não somente para a manufatura de produtos tradicionais como alimentos e bebidas fermentadas, mas também para a aplicação em indústrias farmacêuticas e bioquímicas, destacando-se alguns produtos e processos como enzimas, enriquecimento protéico de alimentos fermentados,

detoxificação biológica, ácida orgânicos, biopesticidas, pigmentos, goma xantana, ácidogiberélico, cogumelos comestíveis, etanol, biogás, etc (Soccol & Vandenberghe, 2003).

Os resíduos de processos agroindustriais podem ser usados como substrato para crescimento microbiano, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (Mahmood et al., 1998)

### 2.3.1 Resíduos utilizados em fermentação semi-sólida

A indústria alimentícia, especialmente a indústria de sucos, gera uma enorme quantidade de resíduos provenientes do processamento das frutas, obtendo-se ao final do processo quantidades apreciáveis de casca, albedo e sementes, que quando descartados inadequadamente acarretam graves conseqüências ambientais devido à elevada carga orgânica. Uma alternativa para a minimização do problema consiste no aproveitamento destes resíduos em processos fermentativos, uma vez que estes podem ser usados como substrato sólido e no meio para o crescimento do microrganismo, pois a matéria orgânica que o constitui é utilizada como fonte de energia para o crescimento e carbono para síntese da biomassa celular e outros produtos do metabolismo microbiano (Menezes *et al*. 2006).

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. A implementação de transformação de resíduos de indústrias em produtos de valor agregado podem ser através: da transformação de resíduos em ingredientes para a indústria de sucos e panificação, bioconversão dos resíduos por fermentação em estado sólido (e também fermentação submersa) ou como bioadsorventes (fixadores) em tratamentos de resíduos (Pelizer, 2007).

Diversos subprodutos agro-industriais têm sido usados como substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por apresentar uma fonte alternativa de baixo valor comercial (Silva, 2009).

Na região Amazônica possui uma variedade de fruteiras consideradas potenciais e dentre elas se destacam: o açaí (*Euterpe oleracea Mart*.) e o cupuaçu (*Theobroma grandiflorum Shum*), devido a seu elevado potencial econômico e valores nutricionais. ão utilizados na elaboração de vários produtos alimentícios, desde que se aplique uma tecnologia adequada.

O açaí é um fruto rico em antioxidantes e aminoácidos (Coisson et al, 2005; Schauss et al., 2006), tido como uma das frutas mais nutritivas da bacia Amazônica. Além disso, destaca-se entre as frutas quanto ao seu teor lipídico (Rogez, 2000). Em sua composição o açaí também possui carotenóides e ácido ascórbico (Spada et al., 2008), além de fibras (Yuyama et al., 2002).

Estas características descoberta na ultima década têm aumentado a procura pelo fruto amazônico no mercado regional, nacional e internacional. Elevando a produção do fruto de açaí de acordo com o IBGE (2008) sua produção somou em 2008, 101,341 toneladas, sendo o Estado do Pará o principal produtor do fruto, concentrando 94% desta produção.

O cupuaçu possui excelente potencial de mercado para exploração da polpa, a mucilagem que envolve as sementes, sendo facilmente reconhecidos em razão do aroma agradável que exalam facilitando a comercialização da polpa pasteurizada/congelada, em embalagens de polietileno de 200g e 1 kg, e em tambores de 200 L. As duas primeiras formas são utilizadas para a comercialização local e a última, quando o produto é comercializado para fora das fronteiras do estado.

Pesquisas mostram que atualmente a produção do cupuaçu chega a 32 toneladas de fruto, representando 8,9% do valor bruto da produção do Estado do Pará (IBGE 2008).

A fruticultura regional também gera considerável volume de resíduos, destacando-se o cultivo do cupuaçuzeiro e o do açaí. Ambos os frutos são utilizados na fabricação de sucos, doces, geléias e sorvetes. A casca e a semente desses frutos quando descartada no ambiente se torna substrato para microrganismos oportunistas, proporcionando até o crescimento de fitopatógenos. Atualmente parte desse resíduo vem sendo usado como adubo ou com fonte de biomassa para produzir energia, uma pesquisa em desenvolvimento na coleção de cultura DPUA/UFAM.

# 3 OBJETIVO GERAL

Esta pesquisa tem como objetivo avaliar a produção de proteases por 13 linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis* da Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas – DPUA, para selecionar uma espécie promissora quanto à produção de proteases coagulante para fabricação de queijo.

**Objetivos Específicos**

- Determinar a atividade proteolítica e coagulante por fermentação semi-sólida utilizando resíduo agroindustrial amazônico;

- Selecionar uma espécie promissora quanto a atividade proteolítica e potencial coagulante;

- Verificar a influência da idade e tamanho do inóculo associado ao tempo de fermentação;

- Caracterizar as proteases quanto à temperatura e pH ótimo e estabilidade da temperatura e pH;

- Avaliar a potencialidade das proteases como coagulante na produção de queijo.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1.Micro-organismos

Nesta pesquisa foram avaliados 13 *Aspergillus flavo-furcatis* cedidos pela Coleção de Culturas DPUA, Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para a reativação dos fungos anamorficos, de cada cultura foi transferido um fragmento para a superfície de ágar CYA [Czapek com extrato de levedura 0,5% (p/v)] em placas de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 ºC por sete dias, conforme recomendação de (Kclich e Pitt, 1988).

## 4.2. Cultivo monospórico e autenticação

Em cada subcultivo de *Aspergillus flavo-furcatis* foi preparada uma suspensão e ao término da dispersão dos esporos com alça de níquel cromo os tubos foram agitados em vortex. Desta suspensão foram preparadas diluições sucessivas até a obtenção de três esporos em 10µL. Para obtenção das culturas monosporicas, da suspensão contendobaixa densidade celular, com um swab as estruturas de reprodução foram semeadas na superfície de ágar-água 1,8% (p/v). (Gams et al., 1975). Os cultivos foram mantidos a 25 °C. Após a germinação, cada esporo foi transferido para a superfície de ágar CYA e os cultivos mantidos a 25 °C por sete dias (Kclick e Pitt, 1988). A autenticação de *A. flavo-furcatis,* foi realizada com base nas características morfológicas, comparadas com a chave de identificação propostas por Raper e Fennel (1977).

## 4.3. Produção das proteases

### 4.3.1.Preparação dos resíduos

Os resíduos agroindustriais utilizados para a produção dos resíduos foram farelo de arroz, semente de açaí e casca de cupuaçu provenientes do comércio local do município Manaus-Amazonas. A casca de cupuaçu foi triturada máquina DPM-2, peneira 25 mm e tratada segundo protocolo padronizado pela Coleção de Cultura DPUA.

### 4.3.2.Fermentação semi-sólida (FSS)

A casca de cupuaçu (CC+FA) e semente de açaí (AS+FA) foram misturadas com farelo de arroz, separadamente, e cada mistura de substrato foi pesada e hidratada com água destilada para ajustar o conteúdo de umidade a 60%. Quando necessário o pH foi aferido para 6. A FSS foi realizada em frascos de vidro contendo 200 g de CC+FA ou 200 g de AS+FA. Os resíduos foram esterilizados a 121 °C por 60 minutos, durante três dias consecutivos. Após resfriamento, nos substratos foram inoculados, superficialmente, 12 discos miceliais de 10 mm de diâmetro das culturas de *Aspergillus flavo-furcatis* obtidas em ágar CYA. A FSS foi conduzida a 30 ºC durante cinco dias.

### 4.3.3. Extração das proteases

A extração das protease foi realizada com água destilada esterilizada (5:1 v/p) sob

agitação constante (150 rpm, 30 minutos, a 30 ºC). O extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de algodão, e centrifugação a 8.000 x*g* por 10 minutos, a 4 ºC.

### 4.3.4. Determinação da atividade de proteases

A atividade proteolítica foi determinada segundo metodologia de Leighton (1973), 150 µL do extrato bruto foram adicionados a 250 µL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, mistura reacional foi mantida durante 60 minutos em câmara escura. Em seguida foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v) e o resíduo remanescente removido por centrifugação (8.000 x*g*) a 4ºC por 10 minutos. Do sobrenadante 1,2 mL foi retirado e homogenizado com 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,01 em uma hora a 440 nm e expressa em U/mL (Kirsch et al., 2011).

## 4.4. Efeito de diferentes parâmetros na atividade de protease utilizando um planejamento fatorial

Nesta etapa a avaliação da influência da idade do inóculo, tamanho do inóculo e do tempo de fermentação na atividade proteolítica foi realizada apenas com a espécie que expressou características morfológicas avaliada através de um planejamento fatorial $2^3$ com 4 pontos centrais. Os níveis das variáveis são mostrados na Tabela 1. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 30º C. Atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item da determinação da atividade de protease.

Tabela 1.: Fatores utilizados no planejamento fatorial $2^3$ para avaliar a produção de proteases

| Fatores | Levels | | |
|---|---|---|---|
| | Inferior (-1) | Central (0) | Superior (+1) |
| Idade do inóculo | 10 | 12 | 14 |
| Tamanho do inoculo | 6 | 12 | 18 |
| Tempo de fermentação | 5 | 10 | 15 |

## 4.5. Efeito do pH das proteases

Para determinar o efeito do pH na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram preparados em triplicata, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato nos tampões: solução tampão citrato 0,1 M (4-6), solução tampão fosfato 0,1 M (6-8) e tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M (9-10) (Petinate et al., 1999). As amostras incubadas durante uma hora, seguindo a determinação da atividade proteolítica.

## 4.6. Efeito da temperatura na atividade das proteases

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado incubando-se a

reação nas temperaturas de 25 ºC, 37 ºC, 40 ºC, 60 ºC por uma hora, seguindo-se a determinação da atividade proteolítica.

### 4.7. Bioensaio de toxicidade utilizando *A. salina* da espécie selecionada

A avaliação de toxidade do extrato de *A. flavo-furcatis* DPUA 1463 foi realizada segundo Harwig; Scott, (1971); Rice; Maness, (2004). Os náuplios de *A. salina* foram obtidos adicionando-se 0,1 g de cistos comerciais em 100 mL de solução de sal marinho não iodado 3% (p/v), pH 6,5, em frasco Erlenmeyer (500mL) incubado a 30 ºC, 140 rpm durante 36 horas, sob iluminação constante.

O bioensaio foi realizado em poços individuais de placas multipoços (6x4) pela adição de 0,2 mL de extrato bruto (1mg/mL ou 2mg/mL) e 1 mL de suspensão de náuplios de *A. salina*. As placas foram mantidas sob luminosidade (40 watts), 30 ºC, por 24 horas. Após esse período, a mortalidade de *A. salina* foi determinada em estereomicroscópio com base na imobilidade interna ou externa, durante 20 segundos.

No tratamento controle foi utilizada somente a solução salina e todos os testes foram realizados em triplicata (Teixeira, 2011).

A taxa de mortalidade foi calculada conforme a fórmula seguinte e o grau de toxidade foi classificado de acordo com a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico (NT); 10-49% = ligeiramente tóxico (LT); 50-89% = tóxico (T); 90-100% = altamente tóxico (AT) (Harwig; Scott, 1971).

% mortalidade = (número de indivíduos mortos)/(número total de indivíduos)

## 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão). ANOVA, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Minitab 16.

# Capítulo 02

Artigo a ser submetido e Depósito de patatente

# AVALIAÇÃO DOS RESÍDUOS AGROFLORESTAIS AMAZÔNICOS E O SEU EFEITO NA PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Aspergillus flavo-furcatis*

Meire Rossy Oliveira da Cruz[1]; Valéria Carvalho Santos Ebinuma[2], Rosana Antunes Palheta[3], Maria Francisca Simas Teixeira[4]

[1,3,4]Universidade Federal do Amazonas – Instituto de Ciências Biológicas
Caixa Postal – Manaus – AM - E-mail: meirerossy@hotmail.com
[2]Universidade de São Paulo – Depto. de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Caixa Postal 66083

**Resumo**

As proteases possuem alto valor comercial no mercado mundial de enzimas, cujas fontes são vegetais, fungos e bactérias. Esta pesquisa tem como objetivo avaliar os resíduos agroflorestais e o efeito de parâmetros na produção de protease por *Aspergillus flavo-furcatis* da Coleção de Culturas DPUA. As 13 linhagens de *A.flavo- furcatis* foram submetidas à fermentação no estado semi-sólido em semente de açaí e casca de cupuaçu suplementados com farelo de arroz, a 25 ºC em 5 dias. A atividade proteolítica foi realizada utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato nos tampões em condições padronizadas. Em 100% dos extratos foi determinada a atividade das enzimas. As linhagens de *A. flavo-furcatis* expressaram atividade proteolítica nos dois resíduos agroflorestais. Em semente de açaí suplementado com farelo de arroz a média da atividade proteolítica foi 46,32% superior da determinada em cupuaçu e farelo de arroz (465,50 U/mL). As condições de cultivo que proporcionaram aumento expressivo na atividade proteolítica foram inóculo com 10 dias de cultivo, a fermentação em cinco dias. Desta maneira, pode-se concluir que as linhagens de *A. flavo-furcatis* são fontes promissoras de proteases para futura aplicação industrial quando cultivados em resíduos agroflorestais amazônicos.

**Palavras-chave**: Enzimas proteolíticas, fermentação semi-sólida, matriz sólida, *Aspergillus*.

## INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas são produzidas por plantas, animais e microrganismos. No entanto, os microrganismos são a fonte preferencial de proteases devido a sua ampla diversidade bioquímica, suscetibilidade para manipulação genética, além de possuírem características desejadas para aplicações industriais (Sandhya, 2005; Ramakrishina *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, espécies de *Aspergillus* têm despertado interesse para aplicação em processos industriais, com predominância como fonte de enzimas para indústria de alimentos e detergentes. Inseridos nesse grupo estão *A. niger, A. oryzae, A. terreus* e *A. clavatus* (Reddy et al., 2009; Chakrabrati et al., 2002).

Em relação à *Aspergillus flavo-furcatis,* além de não ser causador de patologias. Trata-se de uma espécie pouco estudada quanto à produção de compostos bioativos, a exemplo de proteases e micotoxinas (Hedayati et al., 2007; Nascimento; Martins, 2006; Abidi et al., 2008).

Do grupo de enzimas disponíveis no mercado mundial, as proteases se destacam e somam cerca de 60% do total de biocatalisadores comercializados. Estas enzimas apresentam uma ampla variedade de aplicações nas indústrias de detergente, farmacêutica, de diagnósticos, na indústria química e alimentos, para a produção de queijo, iogurte, cerveja, molho de soja, processamento de carne, dentre outros (Monteiro et al., 2005;Nishiwaki, 2009).

Proteases podem ser produzidas por fermentação em meio líquido ou em uma matriz sólida (Gupta et al., 2008). Nesse último bioprocesso o crescimento do microrganismo e a formação dos produtos de interesse ocorrem na superfície do substrato sólido próximo na ausência de água livre e em condições mais similares ao habitat natural dos microrganismos.

Além dessas características a fermentação semi-sólida tem como vantagem o aproveitamento de resíduos gerados pela agroindústria, agregando valor comercial a estes, além da redução de custos e a facilidade de recuperação do produto final do meio de cultivo (Canteri et. al., 2008; García-Gómez et. al.; 2009).

Na região Norte do Brasil são gerados resíduos orgânicos oriundos do processamento da fruticultura regional. Entre os descartes orgânicos está o resíduo do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) e o açaí (*Euterpe oleracea)*. A casca e semente desses frutos quando descartadas no ambiente tornam-se substratos adequados para o crescimento de microrganismos oportunistas até mesmo de fitopatógenos (Silva, 2009). Este trabalho teve como objetivo avaliar os resíduos agroflorestais amazônicos e o efeito de parâmetros na produção de protease por *Aspergillus flavo-furcatis* da Coleção de Culturas DPUA utilizando a tecnologia de fermentação semi-sólida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Micro-organismos

Nesta pesquisa foram avaliados 13 *Aspergillus flavo-furcatis* cedidos pela Coleção de Culturas DPUA, Universidade Federal do Amazonas-UFAM. Para a

reativação dos fungos anamorficos, de cada cultura foi transferido um fragmento para a superfície de ágar CYA [Czapek com extrato de levedura 0,5% (p/v)] em placas de Petri. Os cultivos foram mantidos a 25 ºC por sete dias, conforme recomendação de (Kclich e Pitt, 1988).

**Cultivo monospórico e autenticação**

Em cada subcultivo de *Aspergillus flavo-furcatis* foi preparada uma suspensão e ao término da dispersão dos esporos com alça de níquel cromo os tubos foram agitados em vortex. Desta suspensão foram preparadas diluições sucessivas até a obtenção de três esporos em 10µL. Para obtenção das culturas monosporicas, da suspensão contendobaixa densidade celular, com um swab as estruturas de reprodução foram semeadas na superfície de ágar-água 1,8% (p/v). (Gams et al., 1975). Os cultivos foram mantidos a 25 °C. Após a germinação, cada esporo foi transferido para a superfície de ágar CYA e os cultivos mantidos a 25 °C por sete dias (Kclick e Pitt, 1988). A autenticação de *A. flavo-furcatis,* foi realizada com base nas características morfológicas, comparadas com a chave de identificação propostas por Raper e Fennel (1977).

**Produção das proteases**

**Preparação dos resíduos**

Os resíduos agroindustriais utilizados para a produção dos resíduos foram farelo de arroz, semente de açaí e casca de cupuaçu provenientes do comércio local do município Manaus-Amazonas. A casca de cupuaçu foi triturada máquina DPM-2, peneira 25 mm e tratada segundo protocolo padronizado pela Coleção de Cultura DPUA.

**Fermentação semissólida (FSS)**

A casca de cupuaçu (CC+FA) e semente de açaí (AS+FA) foram misturadas com farelo de arroz, separadamente, e cada mistura de substrato foi pesada e hidratada com água destilada para ajustar o conteúdo de umidade a 60%. Quando necessário o pHfoi aferido para 6. A FSS foi realizada em frascos de vidro contendo 200 g de CC+FA ou 200 g de AS+FA. Os resíduos foram esterilizados a 121 °C por 60 minutos, durante três dias consecutivos. Após resfriamento, nos substratos foram inoculados, superficialmente, 12 discos miceliais de 10 mm de diâmetro das culturas de *Aspergillus flavo-furcatis* obtidas em ágar CYA. A FSS foi conduzida a 30 ºC durante cinco dias.

**Extração das proteases**

A extração das protease foi realizada com água destilada esterilizada (5:1 v/p) sob agitação constante (150 rpm, 30 minutos, a 30 ºC). O extrato bruto foi recuperado por filtração em tecido de algodão, e centrifugação a 8.000 x*g* por 10 minutos, a 4 ºC.

**Determinação da atividade de proteases**

A atividade proteolítica foi determinada segundo metodologia de Leighton (1973), 150 µL do extrato bruto foram adicionados a 250 µL de azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, mistura reacional foi mantida durante 60 minutos em câmara escura. Em seguida foram adicionados 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v) e o resíduo remanescente removido por centrifugação (8.000 x*g*) a 4ºC por 10 minutos. Do sobrenadante 1,2 mL foi retirado e homogenizado com 1,4 mL de hidróxido de sódio 1M, procedendo-se a leitura a 440 nm. Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorbância de 0,01 em uma hora a 440 nm e expressa em U/mL (Kirsch et al., 2011).

**Efeito de diferentes parâmetros na atividade de protease utilizando um planejamento fatorial**

Nesta etapa a avaliação da influência da idade do inóculo, tamanho do inóculo e do tempo de fermentação na atividade proteolítica foi realizada apenas com a espécie que expressou características morfológicas avaliada através de um planejamento fatorial $2^3$ com 4 pontos centrais. Os níveis das variáveis são mostrados na Tabela 1. A fermentação semi-sólida foi conduzida a 30º C. Atividade proteolítica foi determinada conforme descrito no item da determinação da atividade de protease.

Tabela 1.: Fatores utilizados no planejamento fatorial $2^3$ para avaliar a produção de proteases

| Fatores | Levels | | |
|---|---|---|---|
| | Inferior (-1) | Central (0) | Superior (+1) |
| Idade do inóculo | 10 | 12 | 14 |
| Tamanho do inoculo | 6 | 12 | 18 |
| Tempo de fermentação | 5 | 10 | 15 |

**Efeito do pH das proteases**

Para determinar o efeito do pH na atividade proteolítica, o sistema de reação e o branco foram preparados em triplicata, utilizando azocaseína 1% (p/v) como substrato nos tampões: solução tampão citrato 0,1 M (4-6), solução tampão fosfato 0,1 M (6-8) e tampão carbonato-bicarbonato de sódio 0,1 M (9-10) (Petinate et al., 1999). As amostras incubadas durante uma hora, seguindo a determinação da atividade proteolítica.

**Efeito da temperatura na atividade das proteases**

O efeito da temperatura na atividade proteolítica foi determinado incubando-se a reação nas temperaturas de 25 ºC, 37 ºC, 40 ºC, 60 ºC por uma hora, seguindo-se a determinação da atividade proteolítica.

**Bioensaio de toxicidade utilizando *A. salina* da espécie selecionada**

A avaliação de toxidade do extrato de *A. flavo-furcatis* DPUA 1463 foi realizada segundo Harwig; Scott, (1971); Rice; Maness, (2004). Os náuplios de *A. salina* foram obtidos adicionando-se 0,1 g de cistos comerciais em 100 mL de solução de sal marinho não iodado 3% (p/v), pH 6,5, em frasco Erlenmeyer (500mL) incubado a 30 ºC, 140 rpm durante 36 horas, sob iluminação constante.

O bioensaio foi realizado em poços individuais de placas multipoços (6x4) pela adição de 0,2 mL de extrato bruto (1mg/mL ou 2mg/mL) e 1 mL de suspensão de náuplios de *A. salina*. As placas foram mantidas sob luminosidade (40 watts), 30 ºC, por 24 horas. Após esse período, a mortalidade de *A. salina* foi determinada em estereomicroscópio com base na imobilidade interna ou externa, durante 20 segundos.

No tratamento controle foi utilizada somente a solução salina e todos os testes foram realizados em triplicata (Teixeira, 2011).

A taxa de mortalidade foi calculada conforme a fórmula seguinte e o grau de toxidade foi classificado de acordo com a mortalidade observada: 0-9% = não tóxico (NT); 10-49% = ligeiramente tóxico (LT); 50-89% = tóxico (T); 90-100% = altamente tóxico (AT) (Harwig; Scott, 1971).

% mortalidade = (número de indivíduos mortos)/(número total de indivíduos)

**Análise estatística**

Os resultados das atividades enzimáticas foram submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão). ANOVA, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Minitab 16.

## RESULTADO

**Produção de protease por fermentação semi-sólida**

A atividade proteolítica das 13 linhagens de *Aspergillus flavo-furcatis* estão apresentadas na Figura 1. Os resultados demonstraram que em 100% dos extratos foi determinada a atividade das enzimas quando foi utilizado disco micelial como inóculo e no substrato casca de cupuaçu ou semente de açaí, ambas suplementadas com farelo de arroz. Entre os substratos base utilizados na fermentação, semente de açaí foi o mais eficiente para a produção das enzimas proteolíticas extracelulares, no qual a atividade média foi 867,11 U/mL, valor superior 46,32 % da atividade detectada nos extratos recuperados da casca de cupuaçu.

Entre os *Aspergillus* avaliados, a atividade de valor significativo de protease (929,2 U/mL) foi expressa por *A. flavo-furcatis* DPUA 1608 quando no bioprocesso foi utilizado semente de açaí. Em casca de cupuaçu, *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1539 foi o que expressou maior atividade (619,77 U/mL). Estes resultados são relevantes quando comparados a 79,71 $Ul^{-1}$ e 120,78 $Ul^{-1}$, valores da atividade proteolítica de *Aspergillus oryzae* TCC 2095 determinados no extrato bruto obtido por fermentação semi-sólida em foi farinha de peixe (García-Gómez et al.,2009).

Na fermentação semi-sólida, o bom rendimento dos biocompostos está associado às condições de crescimento dos micro-organismos, bem como a disponibilidade de nutriente e o teor da umidade no substrato, fatores que influenciam no desenvolvimento microbiano e do produto final (Naidu, 2010).

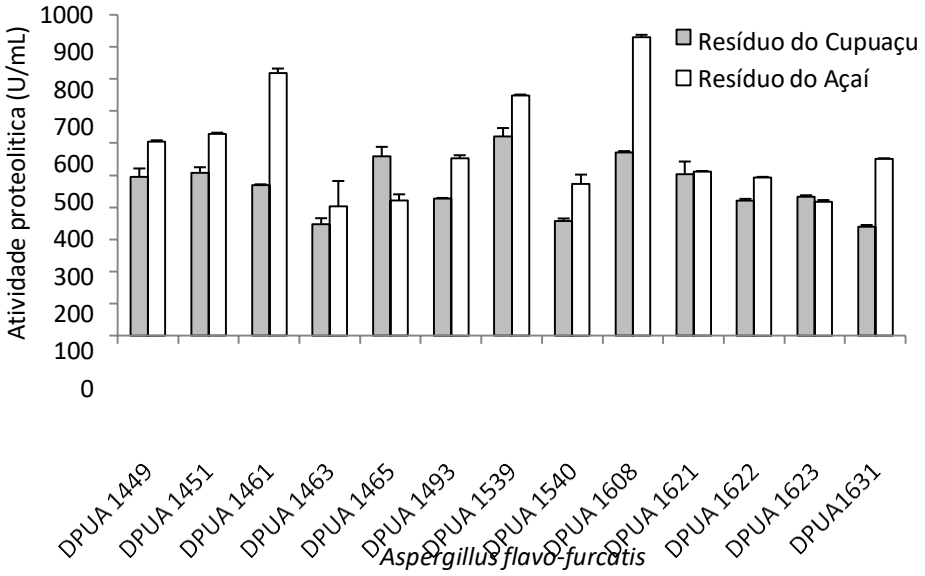



Figura 3-Atividade proteolítica de linhagens de *A. flavo-furcatis* em semente de açaí suplementado com farelo de arroz (SAFA) e casca de cupuaçu suplementado com farelo de arroz (CCFA). Valores expressos para comparação de médias de acordo com ANOVA, com nível de significância de 5%, utilizando-se o software Statistica 6,0.

**Efeito de diferentes parâmetros na atividade de protease de *A. flavo-furcatis* DPUA 1463**

Nos testes para avaliação do tamanho e idade do inóculo, assim como, do tempo de fermentação foi escolhido de forma aleatória *Aspergillus flavo-furcatis* DPUA 1463. A influência das diferentes variáveis estão apresentadas na Figura 2. O gráfico de Pareto revela que a atividade de proteases foi influenciada significativamente pelas variáveis idade do inóculo e tempo de fermentação, onde as melhores respostas foram obtidas nos cultivos de *Aspergillus flavo-furcatis* quando foi utilizado os menores níveis das variáveis testadas. Assim a melhor condição de cultivo para a linhagem avaliada quanto à produção de proteases foi idade do inoculo, 10 e cinco dias de fermentação. O tamanho do inóculo não apresentou influência significativa na produçãoda enzima investigada. Todavia, as interações das três variáveis avaliadas influenciam significativamente na atividade das enzimas. Em conclusão os resultados demonstraramum aumento de 57% na atividade proteolítica quando no bioprocesso foi utilizado comoinóculo culturas em Agar CYA, com 10 dias de crescimento, 18 discos miceliais e a fermentação realizada durante cinco dias. Estes dados estão em concordância com as citações de Pandey et al. (2008).

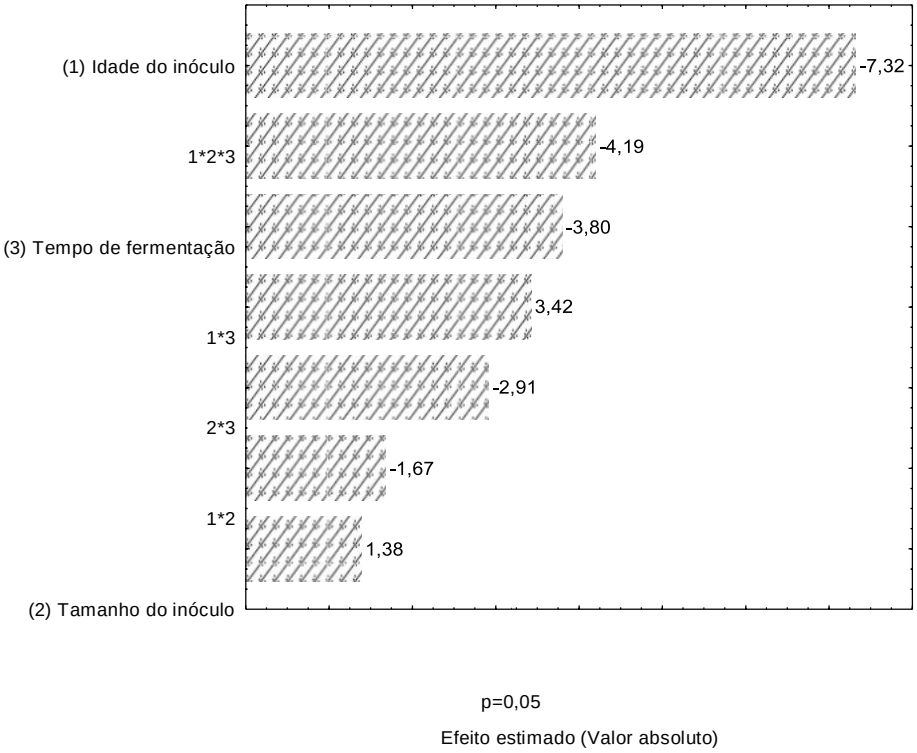



Figura 2. Gráfico de Pareto obtidos no estudo de padronização das variáveis e sua significância nos processos experimentais

## Efeito do pH na atividade proteolítica

Os dados obtidos mostraram que em todos os pH testados foi determinada a atividade das enzimas. Das enzimas produzidas por *Aspergillus flavo-furcatis* o pH ótimo foi determinado em 6,0 e 10,0 (Figura 3). No extrato bruto de *A. flavo-furcatis* estão proteases ácidas e alcalinas, biocatalizadores de importância para industria de alimentos e detergentes. Trabalhos recentes mostraram pH ótimo 6,0 para proteases de *A. fumigatus e A. tubingensis* na pesquisa realizada por Hernández-Martínez *et al*. (2011) e Morya (2010), Srinubabu et al. (2007) determinou pH ótimo 10,0 para protease de *A. oryzae* nos cultivos realizados em meio líquido.

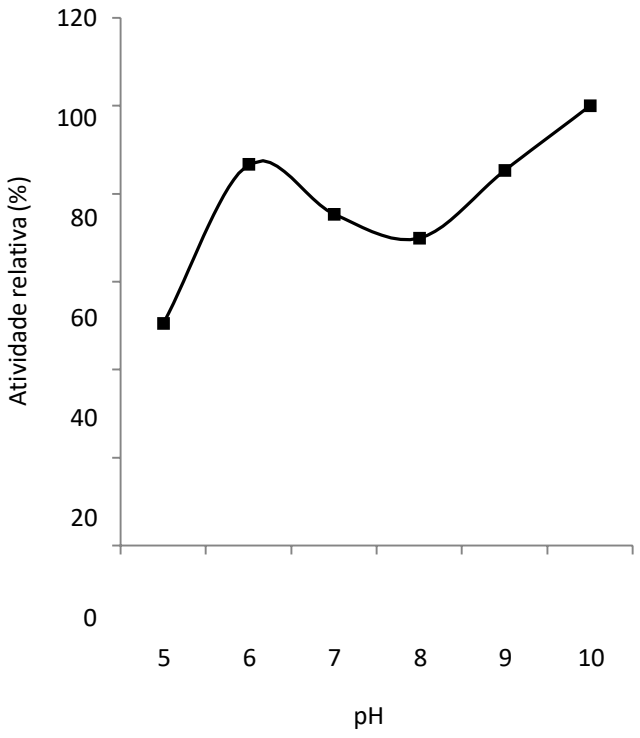



Figura 3. Efeito do pH na atividade proteolítica do extrato bruto de *A. flavo-furcatis* DPUA 1463. Solução-Tampão: Citrato-Fosfato 0,1 M (pH 6,0 e 8,0), Tris-HCl 0,2 M (pH 7,2), Carbonato-Bicarbonato 0,2 M (pH 9,0 e 10,0).

## Efeito da temperatura na atividade proteolítica

O efeito da temperatura na atividade proteolítica de *Aspergillus flavo-furcatis* está apresentado na figura 4. As enzimas permaneceram ativas nas condições de análise, porém a temperatura ótima foi determinada a 40 °C. Quando submetidas a 37°C e 50 °C, a atividade proteolítica expressou valores significativos. Estes resultados estão corroborando com os citados por García-Gómez *et al*. (2009), que ao caracterizar as enzimas de *Aspergillus oryzae* detectou temperatura ótima de atividade a 50 °C.

Morya (2010) observou a temperatura ótima de atividade a 40°C para proteases de *A. tubingensis.*

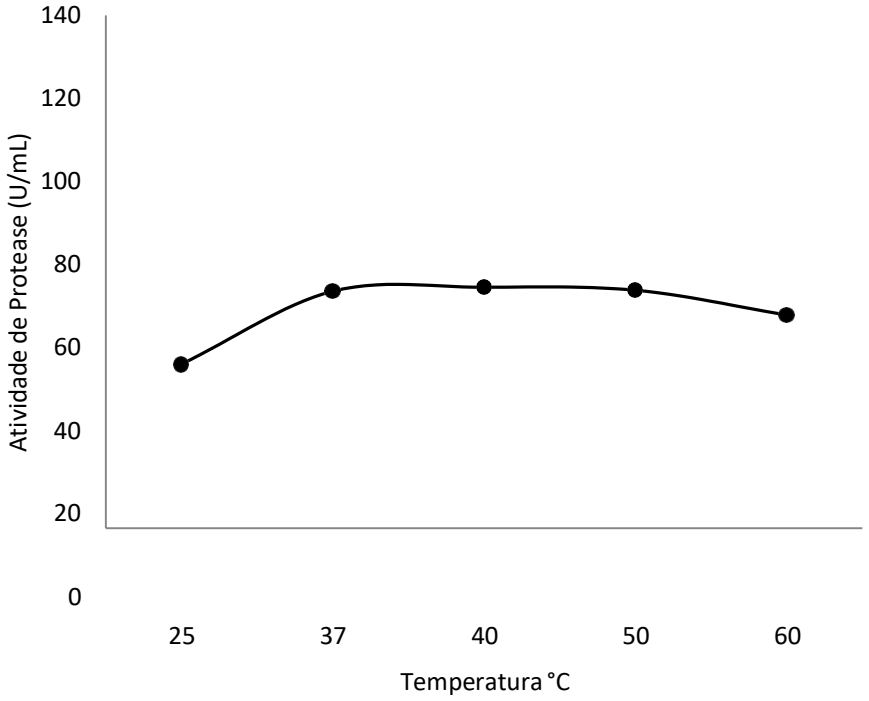



Figura 4. Efeito da temperatura na atividade proteolítica do extrato de A. flavo-furcatis DPUA 1463. Temperaturas: 25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C e 60 °C.

**Teste de toxicidade da espécie selecionada**

O extrato proteolítico de *A. flavo-furcatis* apresentou taxa de mortalidade igual a 0% (1 mg/mL) e 10% (2mg/mL) , nas concentrações testadas, sendo classificados como não tóxico a ligeiramente tóxico segundo a classificação Harwig; Scott (1971). Diversos trabalhos empregam *Artemia salina* como teste de triagem, *in vitro*, indicador de citotoxidade de diferentes moléculas (Fedrigo, 2011).

## CONCLUSÃO

As linhagens de *A. flavo-furcatis* da micobiota Amazônica investigadas são fontes de proteases e a linhagem DPUA 1608 foi que expressou maior atividade proteolítica em comparação com as demais linhagens investigadas. Os resíduos agroflorestais utilizados nos processos fermentativos, mostraram eficiência para a produção de enzimas proteolíticas e a combinação entre semente de açaí e farelo de arroz foi o substrato que forneceu significativamente a produção das enzimas. As condições de cultivo que proporcionaram aumento expressivo na atividade proteolítica foram idade do inóculo(10 dias); tempo de fermentação (cinco dias) e a interação entre a idade do inóculo, tamanho do inóculo e dias de fermentação. Nas condições de análise, protease de *A. flavo-furcatis* demonstrou atividade ótima a 40 °C, pH 6,0 e 10,0.

## REFERÊNCIAS


Abidi, F.; Limam, F.; Nijib, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cineria* using economic raw materials: assay as biodetergent. Process Biochemistry, 43: 1202-1208. 2008.

Canteri, M. H. G.; Loss, E.; Barana, A. C. Breve panorama do gerenciamento de resíduo sólido em indústrias alimentícias no Brasil. VI Semana de Tecnologia em Alimentos; 2(34). 2008.

Chakrabarti, A., Sethi, S., Raman, D. S. & Behera, D. Eight-year study of allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Indian teaching hospital. Mycoses 45, 295–299. 2002.

Frederigo, H. I.; Borgo, A. P. ; Baggio, F.R.; Musial, D.C.; Valentini, S.A. Obtençãõ de formas cosméticas a partir do extrato aquoso de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Revista Saúde e Pesquisa, v.4, n. 2, p. 207-212. 2011.

Gams, W., *et al*. Course of Mycology. 1. ed. USA: Academy Sciences and Letters, p. 104. 1975.

García-Gómez, M.J.; Huerta-Uchoa, S.; Loera-Corral, O.; Prado-Barragán, L.A. Advantages of a proteolytic extract by *Aspergilus oryzae* from fish flour over a commercial proteolytic preparation. *Food Chemistry* 112:604-608. 2009.

Gupta, A.; Joseph, B.; Mani, A.; Thomas, G. Biosynthesis and properties of na extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenticus*. World J. Microbiol. Biotechnol, 24: 237-243. 2008.

Harwig J, Scott P. Brine shrimp (Artemia salina) larvae as a screening system for fungal toins. Appl Environ Microbiol 21:1011-1016. 1971.

Hedayati, M. T.; Pasqualotto, A. C.; Warn, P. A.; Bowyer, P.; Denning, D. W. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677–1692. 2007.

Hernández-Martínez, R., Gutiérrez-Sánchez, G.; Bergman, C. W.; Loera-Corral, O.; Rojo-Dominguez, A.; Huerta-Uchoa, C.; Regalado-Gonzalez, C.; Prado- Barragan, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry 46: 2001-2006. 2011.

Kirsch, L.S; Pinto, A.C.S.;Porto, T.S.;Porto,A.L.F.;Teixeira,M.F.S. The influence of different submerged cultivation conditions on mycelia biomass and protease production by *Lentinus citrinus* Walleyn et Rammeloo DPUA 1539 (Agaricomycetideae). International Jornal of medicinal mushrooms, 13(2): 185-192 2011.

Klich, M. A. & Pitt, J. L. Differentiation of *Aspergillus flavus* from *A. parasiticus* and other closely related species. Trans Br Mycol Soc 91, 99–108. 1988.

Morya,K.V; Dinesh, Y. Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of Aspergillus tubingensis NIICC-08155. The Internet Journal of Microbiology ISSN: 1937-8289, 2010.

Monteiro, T.I.R.C., Porto, T.S.; Carneiro-Leão, A.M.A.; Silva, M.P.C.; Carneiro-da-Cunha, M.G. Reversed micellar extration of na extracellular protease from *Nocardiopsis* sp. fermentation broth. *Biochemical Engineering Journal*. 24:87-90. 2005.

Naidu, T.; Meon, S.; Kadir, J.; Siddiqui, Y. Microbial starter for the enhancement of biological activity of compost tea. International jornal of Agriculture &biology:1814-9596 ;2010.

Nascimento, W. C. A.; Martins, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência Tecnol. Aliment*. 26(3):582-588. 2006.

Nishwaki, T.; Asano, S.; Ohyama, T. Properties and substrate of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengeneering.* Elsevier. 107:605-609. 2009.

Pandey,A.; Soccol, C.R.; Larroche, C. Current developments in solid-state fermentation. 2008.

Petinate, SDG, Branquinha, MH, Coelho, RRR, And, ABV and Giovanni-De-Simone, S. Purification and partial characterization of an extracellular serine-proteinase of Streptomyces cyaneus isolated from Brazilian cerrado soil. Journal of Applied Microbiology Volume 87, Issue 4, pages 557–563. 1999.

Ramakrishna, D.P.N.; Gopi, N.R.; Rajagopal, S.V. Purificaton and properties of extra cellular alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* ( MTTC NO-10110). *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6:493-504. 2010.

Raper, K. B.; Fennell, D. I. The Genus *Aspergillus*. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, 686p. 1977.

Reddy, K.R.N.; Abbas, H.K., Abel, C.A.; Shirer, W.T.; Oliveira, C.A.F. & Raghavender C.R. Mycotoxin contaminantion of commercially important agricultural commodities. Toxin Reviews 28: 154-168. 2009.

Samson, R. A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Varga, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies in Mycology. 2007; 59: 129-145.

Sandhya, C.H., Sumantha, A.; Szakacs. G.; Pandey, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem2005;40: 2689-94. 2005.

Silva, G. A. B da; 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 substratos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. V.03, n. 01: p.28-41. 2009.

Srinubabu,G;Lokeswari, N.;Jayaraju, K. Screening of nutritional parameters for the production of protease from Aspergillus oryzae.E-Journal of chemistry vol. 4, N 2,p. 208-215. 2007.

Teixeira, M. F. S.; Silva, T.A.; Palheta, R.A.; Carneiro, A. L. B.; Atayde, M. H. Fungos da Amazônia uma riqueza inexplorada. p190-207.2011.

**Depósito de Pedido de Patente**

< Uso exclusivo do INPI >

000033

Espaço reservado ao protocolo | Espaço para etiqueta

## DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: Fundação Universidade do Amazonas
1.2 Qualificação: Instituição Federal de Ensino Superior
1.3 CNPJ/CPF: 04378026000197
1.4 Endereço Completo: Av. Gen. Rodrigo Octávio J. Ramos, 3000 - Setor Norte
1.5 CEP: 69077000 1.6 Telefone: (92)33054532 1.7 Fax: (92)33054513
1.8 E-mail: intellectus@ufam.edu.br

☐ continua em folha anexa

2. **Natureza:** ⦿ Invenção ○ Modelo de Utilidade ○ Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: invenção

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):**

PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LATICÍNIOS UTILIZANDO ENZIMAS COAGULANTES PROVENIENTES DE FUNGOS ASPERGILLUS FLAVO-FUMCATIS, E, USO DE FUNGOS ASPERGILLUS FLAVO-FUMCATIS DPUA 1449, DPUA 1493 E DPUA 1483...

☐ continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão:** do pedido Nº Data de Depósito:

5. **Prioridade:** ☐ interna ☐ unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

| País ou organização de origem | Número de depósito | Data do depósito |
|---|---|---|
| | | |
| | | |
| | | |

6. **Inventor (72):**

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: Maria Francisca Simas Teixeira
6.2 Qualificação: Doutora 6.3 CPF: 02757451200
6.4 Endereço completo: R Damasco, Nº11, Q.23, Conj. Campos Elíseos, Bairro Planalto
6.5 CEP: 69045070 6.6 Telefone: (92)81123158 6.7 Fax: (92)36570971
6.8 E-Mail: mteixeira@ufam.edu.br

☐ continua em folha anexa

INPI Formulário 1.01 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2 )

7. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

☐ 7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao de certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

☐ em anexo

8. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial:** (Período de Graça)
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97) ☐ em anexo

9. **Procurador (74)**

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF: 9.3 AH/CAB:

9.4 Endereço completo:

9.5 CEP: 9.6 Telefone: 9.7 Fax

9.8 E-Mail:

10. **Listagem de sequências biológicas** (documentos anexados) (de Nucleotídeos)

☐ Listagem de sequências em arquivo eletrônico nº de CDs ou DVDs (original e cópia):

☐ Código de controle alfanumérico no formato do código de barras fls.

☐ Listagem de sequências em formato impresso fls.

☐ Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/08 fls.

11. **Documentos anexados** (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ☒ | 11.1 Guia de Recolhimento | 01 fls. | ☒ | 11.5 Relatório descritivo | 11 fls. |
| ☐ | 11.2 Procuração | fls. | ☒ | 11.6 Reivindicações | 01 fls. |
| ☐ | 11.3 Documentos de Prioridade | fls. | ☐ | 11.7 Desenhos | fls. |
| ☐ | 11.4 Doc. de contrato de trabalho | fls. | ☒ | 11.8 Resumo | 01 fls. |
| ☒ | 11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar)<br>Figura (01), Comprovante de pagamento referente a GRU (01), DOU (01), Lei e Dec. da PUA (09). | | | | 09 fls. |

12. **Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11):** 33 fls.

13. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.**

Manaus, 29 de Dezembro de 2011
Local e Data

Maria Paulos Mendes Silva

INPI Formulário 101 – Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (Mod. 101)

## ANEXO DE INVENTORES

**6. Inventor (72)**
6.1 Nome: Thayana Cruz de Souza
6.2 Qualificação: Graduanda do último período do curso de Ciências Biológicas
6.3 CPF: 96097663234
6.4 Endereço: Avenida Amoreira n 28 Renato Souza Pinto I Cidade Nova I
6.5 CEP: 69090220
6.6 Telefones: 9281713317
6.7 E-mail: thayanacruz@gmail.com

**6. Inventor (72)**
6.1 Nome: Rosana Antunes Palheta
6.2 Qualificação: Engenheira Agrônoma, Dra. em Diversidade Biológica
6.3 CPF: 071871007-01
6.4 Endereço: Condomínio Iacitá, 16 Coroado III
6.5 CEP: 69080-291
6.6 Telefones: (92) 8121-6109 (92) 3644-7491
6.7 E-mail: rosanapalheta@ufam.edu.br

**6. Inventor (72)**
6.1 Nome: Meire Rossy Oliveira da Cruz
6.2 Qualificação: Bióloga
6.3 CPF: 804243412-04
6.4 Endereço: Rua 18 n 387 Japiim I
6.5 CEP: 69077-190
6.6 Telefones: 9232377412
6.7 E-mail: meirerossy@hotmail.com

## 6. CONCLUSÃO GERAL

As linhagens de *A. flavo-furcatis* da micobiota Amazônica investigadas são fontes de proteases e a linhagem DPUA 1608 foi que expressou maior atividade proteolítica em comparação com as demais linhagens investigadas. Os resíduos agroflorestais utilizados nos processos fermentativos, mostraram eficiência para a produção de enzimas proteolíticas e a combinação entre semente de açaí e farelo de arroz foi o substrato que forneceu significativamente a produção das enzimas. As condições de cultivo que proporcionaram aumento expressivo na atividade proteolítica foram idade do inóculo(10 dias); tempo de fermentação (cinco dias) e a interação entre a idade do inóculo, tamanho do inóculo e dias de fermentação. Nas condições de análise, protease de *A. flavo-furcatis* demonstrou atividade ótima a 40 °C, pH 6,0 e 10,0.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


Abidi, F.; Limam, F.; Nijib, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cineria* using economic raw materials: assay as biodetergent. Process Biochemistry, 43: 1202-1208. 2008.

Balbi, A.P.C.; Francescato, H.D.C.; Marin, E.C.S.; COSTA, R.S.; Coimbra, T.M. Roles of mitogen-activated protein kinases and angiotensin II in renal development Brazilian Journal of Medical and Biological Research; volume 42, número 1, páginas 38-43. 2009.

Batista, A. C.; Maia, H. S. 1955. Alguns Aspergillales de Contaminação. *Anais soc. Biol*. Pernambuco 13: 91-126.

Bon, E. P. S.; Pereira Jr., N. 1999. Tecnologia enzimática. Rio de Janeiro: E.P.S. 110 p.

Castilho, L. R.; Medronho, R. A. e Alves, T. L. M. (1999), Recovery of pectolytic enzymes produced by solid state culture of *A. niger*. *Process Biochemistry*, v. 34, p. 181-186

Canteri, M. H. G.; Loss, E.; Barana, A. C. Breve panorama do gerenciamento de resíduo sólido em indústrias alimentícias no Brasil. VI Semana de Tecnologia em Alimentos; 2(34). 2008.

Chakrabarti, S. K.; Matsumura, N.; Ranu, R. S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus* (IJIRA 6.2). Current Microbiology, 40: 239-244. 2000.

Coelho, M. A. Z.; Leite, S. G. F.; Rosa, M. F.; Furtado, A. A. L. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. B. CEPPA, 19 (1): 33-42. 2001;

Coïsson, J.D; Piana, Capasso, G; Arlorio. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. Food Research International. Received 9 June 2004. Accepted 25 March 2005. Available online 5 July 2005.

Djamel, C.; Ali, T.; Nelly, C. 2009. Acid Protease Production by Isolated Species of *Penicillium* . *European Journal of Scientific Research*. 3:469-477.

Duarte, A. R.; Duarte, D. M. R.; Moreira, K.A.; Cavalcanti, M.T.H.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F. 2009. *Jacaratia corumbensis* O. Kuntze a New Vegetable Source for Milk-Clothing Enzymes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 52:1-9.

Espósito, T. S. 2006. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macroponum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em

pó. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 98p.

Espósito, T. S. 2006. Aplicação de proteases alcalinas das vísceras do tambaqui (*Colossoma macroponum*) e da carpa (*Cyprinus carpio*) como aditivo de detergentes em pó. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, Pernambuco. 98p.

Fox, P. F.; The milk protein system. In: Fox P. F. editor. Developments in dairy chemistry -4. London: Elsevier; p 1-55. 1989.

Germano, S.; Pandey, A.; Osaku, C.A.; Rocha, S. N.; Soccol, C. R. 2003. Characterization ans stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzymes and Microbial Techology* 32:246-251.

Ghorai, S.; Banik, P.B.; Verma, D.; Chowdhury, S. 2009. Fungal Biotechnology in food and feed processing. *Food Research International*. Elsevier

Gupta, A.; Joseph, B.; Mani, A.; Thomas, G. Biosynthesis and properties of na extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenticus*. World J. Microbiol. Biotechnol, 24: 237-243. 2008

Goud, M.J.P.; Suryam, A.; Lakshmipathi, V.; Charya, M.A.S. 2009, Extracellular hydrolytic enzyme profiles of certain South Indian basiomycetes. *African Journal of Biotechnology* 8:354-360.

Hakkak, R.; Korourian, S.; Ronis, M. J.J.; Johnston, J. M.; Badger, T. M. Soy protein isolate consumption protects against azoxymethane-induced colon tumors in male rats. Cancer Letters. v. 166, p 27-32. 2001.

Hedayati, M. T.; Pasqualotto, A. C.; Warn, P. A.; Bowyer, P.; Denning, D. W. Aspergillus flavus: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153:1677–1692. 2007.

Kumar, C. G.; Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotchnology Advences* 17:561-594.

Klich, M. A.; Pitt, J. I. A Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, 115p. 1988.

Krissansen, G. W. Emerging Health Properties of Whey Proteins and Their Clinical

Implications. Journal of the American college of nutrition. Vol. 26 n. 6. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Disponível em; www.ibge.gov.br. Acesso em 28/05/2010.

Medeiros, V. R. Investigação de enzimas proteolíticas na produção de um leite mais digerível impacto do leite modificado na hipertensão arterial. Dissertação de Mestrado. 2010.

Menezes, G. D. G.; Oliveira, A. C. P.; Damaso, M. C. T.; Oliveira, M. A. C. L.; Couri, S. 2006. Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Revista Universidade Rural* 25:15-27

Mitchell, D. A.; Von Meien, O. F.; Krieger, N. Recent developments in modeling of solid-eerstat fermentation: heat and transfer in bioreactors. Biochemical Engineering Journal, v. 13, p. 137 – 147, 2003.

Monod, M.; Borg-Von, Z. M. 2002. Secreted aspartic proteases as virulence factors of Candida species. *Biological Chemistry* 383(7-8), pp. 1087-93.

Moreira, K. A.;Porto, T.S.; Teixeira, M.F.S.; Porto, A.L.F.; Lima Filho, J.L. 2003. New alkaline protease from *Nocardiopsis* sp.: partial purification and characterization. *Process Biochemistry*. 39: 67-72.

Nascimento, W. C. A.; Martins, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência Tecnol. Aliment*. 26(3):582-588. 2006.

Neurath, M.F., Fuss, I., Kelsall, B.L., Stuber, E. & Strober, W. Antibodies to IL-12 abrogate established experimental colitis in mice. *J. Exp. Med.* 182, 1280−1289 1995.

NIishwaki, T.; Asano, S.; Ohyama, T. 2009. Properties and substrate of proteolytic enzymes from the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Journal of Bioscience and Bioengeneering.* Elsevier. 107:605-609.

Pandey, A.; Socccol, c. R.; Nigam, P.; Sccol, V. T. Biotechnological potencial of agro-industrial residues. I. Sugarcane bagasse. Bioreources Technology, v. 74, p. 69-80. 2000a.

Pelizer, L. H.; Pontieri, M.H.; Moraes, I.O. 2007. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *Journal of Technology Management & Innovation* 2:1.

Ramakrishna, D.P.N.; Gopi, N.R.; Rajagopal, S.V. 2010. Purificaton and properties of

extra cellular alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* ( MTTC NO-10110).*International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6:493-504.

Rao, K.; Narasu, L.2007. Alkaline Protease from *Bacillus firmus* 7728. *African Journal of Biotechnology* 6(21): 2493-2496.

Rao, M. B.; Tanksale, A. M.; Ghatge, M.; Deshpande, V. V. 1998. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and molecular biology review* . p. 597–635.Sept. India,

Raper, K. B.; Fennell, D. I. The Genus *Aspergillus*. New York: Robert E. Krieger Publishing Company, 686p. 1977

Reddy, G. V.; Ravindra Babu, P.; Komaraiah, P.; Roy, K. R. R. M.; Kothari, I. L. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species (*P. ostreatus* and *P. sajor- caju*). Process Biochemistry. 38: 1457-1462. 2003.

Rezer, A. P. S.; Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite UHT integral comercializado no Rio Grande do Sul. Dissertação de Mestrado. 2010

Said e Pietro, R., Enzimas de interesse industrial e Biotecnológico. Editora Eventos, 2002.

Samson, R. A.; Noonim, P.; Meijer, M.; Houbraken, J.; Frisvad, J. C.; Varga, J. Diagnostic tools to identify black aspergilli. Studies in Mycology. 2007; 59: 129-145.

Sandhya, C.H., Sumantha, A.; Szakacs. G.; Pandey, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. Process Biochem2005;40: 2689-94. 2005.

Saran, S.; Isar, J.; Saxena, R.K. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *Journal of Biochemical and Biophysical methods* 1:1-3

Silva, G. A. B da; 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 substratos agroindustriais. Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial. V.03, n. 01: p.28-41. 2009.

Sumantha, A.; Larroche, C.; Pandey, A. 2006. Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol*. 44(2) 211-220.

Thys, R. C. S. 2004. Produção. Caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. kr 10. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

Weingartner, V. Produção e purificação e identificação de mananase obtidos por fermentação no estado sólido utilizado casca de soja e *Aspergillus niger*. Dissertação de mestrado, 2010.

Van Beilen; Li, 2002: Enzyme technology: an overview. Curr Opinion Biotechnol 2002, 13:338-344.

Xiao, F. Modelling energetic particles by a relativistic kappa loss cone distribution function in plasmas,m Plasma Phys. Controlled Fusion, 48, 203. 2006.