



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
UNIDADE ACADÊMICA DE GARANHUNS
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ELIZANE MELO DE ALMEIDA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamaraii* URM 4634
PARA APLICAÇÃO NO AMACIAMENTO DE CARNES.**

GARANHUNS-PE

2018

ELIZANE MELO DE ALMEIDA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamarii* URM 4634
PARA APLICAÇÃO NO AMACIAMENTO DE CARNES.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal Rural de Pernambuco, como
parte das exigências do Curso de Engenharia de
Alimentos, para obtenção do título de bacharel em
Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiana Souza Porto

Co-orientador: Osmar Soares da Silva

GARANHUNS-PE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Ariano Suassuna, Garanhuns - PE, Brasil

A447p Almeida, Elizane Melo de

Produção e purificação de proteases de *Aspergillus tamarii* URM 4634 para aplicação no amaciamento de carnes / Elizane Melo de Almeida. - 2018.

67 f. : il.

Orientador(a): Tatiana Souza Porto.

Co-orientador(a): Osmar Soares da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Engenharia de Alimentos, Garanhuns, BR - PE, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Enzimas proteolíticas 2. Carne 3. Alimentos - Biotecnologia
I. Porto, Tatiana Souza, orient. II. Silva, Osmar Soares da, co-orient.
III. Título.

CDD 641.36

Elizane Melo de Almeida

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEASES DE *Aspergillus tamarii* URM 4634
PARA APLICAÇÃO NO AMACIAMENTO DE CARNES.**

Comissão julgadora do trabalho de conclusão de curso para obtenção do título de Bacharel em
Engenharia de Alimentos

Prof.^a Dr.^a Tatiana Souza Porto (Presidente)
(Unidade Acadêmica de Garanhuns – UFRPE)

Engenheiro de Alimentos - Rodrigo Lira de Oliveira
(Doutorando em Biotecnologia industrial - RENORBIO)

Prof.^a Dr.^a Camila Souza Porto
(Membro Titular externo – UE Penedo/UFAL Campus Arapiraca)

A minha família, em especial
minha mãe Socorro que foi
meu alicerce e me apoiou
incondicionalmente ao longo
dessa caminhada.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao provedor da minha vida, Aquele que nunca me desampara e me dá forças para seguir minha caminhada e batalhar mesmo nos caminhos mais difíceis, sou grata Deus por ser esse Pai onipresente e tão cuidadoso.

À minha família por ser um verdadeiro suporte na minha vida, brigada por todo apoio, amor e força incondicional, sem vocês eu não teria chegado tão longe. Em especial meus pais, Socorro e Heleno, que não pouparam esforços e sonharam junto comigo para que esse momento chegasse e nunca me deixaram perder a fé. Aos meus queridos irmãos Eleandro, Elaine e Evandro que tanto me incentivaram. Aos meus sobrinhos que foram minha alegria em momentos de tristeza e sobrecarga.

Agradeço ao meu noivo Victor, que foi um verdadeiro companheiro em toda essa jornada, obrigada por todo carinho, paciência e compreensão em todas as horas que estive ausente por causa dos estudos, sem você esse caminho teria se tornado muito mais difícil.

À UFRPE/UAG que foi minha segunda casa ao longo desses cinco anos de curso. Ao corpo docente do curso de Engenharia de Alimentos, verdadeiros mestres e que contribuíram tanto para meu crescimento como profissional.

Aos meus queridos amigos que fiz ao longo do curso. Aos parceiros de sala Raiane, Mariana, Vitória, Fernanda e Lucas que compartilharam junto comigo todos os apuros, insegurança e cobrança do nosso curso, desejo o sucesso do mundo a vocês e torço para que cada um possa alcançar seus objetivos. Não poderia deixar de agradecer à minhas eternas companheiras de curso e da vida, Avla e Carol, obrigada por tanta cumplicidade e companheirismo e por tantos momentos de descontração para aliviar um pouco a pressão da faculdade.

Agradeço a toda equipe do CENLAG, em especial todos os meus amigos e parceiros de pesquisa, Allan, Raniele, Renann, Marcos, Rodrigo e Jonatas. Agradeço imensamente pela contribuição que cada um teve para realização desse trabalho. Obrigada por compreender meus momentos de frustração quando os experimentos não saiam como esperado, mas sempre vinha de vocês a dose de ânimo que eu precisava.

Ao querido Doutor Osmar, meu nobre co-orientador e amigo, muitíssimo obrigada pelo imenso e incondicional suporte. Sou muito grata pela confiança que depositou em mim para ser sua parceira de pesquisa. Sempre muito solícito e paciente, de uma dedicação incomparável, um exemplo de profissional. Agradeço demais por tudo que aprendi com você.

Um agradecimento especial a minha querida orientadora Prof^a Dr^a Tatiana Souza Porto, que desde as salas de aula já se mostrava uma profissional de extrema competência e que eu pensava “quero ser assim quando crescer” (risos). Sou infinitamente grata pela oportunidade que me deu de entrar para iniciação científica, o conhecimento adquirido ao longo de dois anos de bancada foi sem dúvida imensurável. Obrigada por além de excelente profissional, ser acima de tudo uma amiga e verdadeira mãe, que nos momentos em que mais precisei demonstrou compreensão e apoio fundamentais. Tenho o maior orgulho e prazer de dizer que fui sua “filha acadêmica”.

Por fim agradeço ao programa PIBIC por meio da UFRPE que fomentou a execução desse trabalho pela disponibilização de recursos, materiais e espaço.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1.1 Mecanismo ilustrativo da hidrólise de uma ligação peptídica e seus produtos finais.....	18
Figura 1.2 Mecanismo comparativo da ação das collagenases de origem animal e collagenases microbianas.....	22
Figura 1.3 Etapas de um processo de produção de enzimas por meio de fermentação.....	23
Figura 1.4 Mecanismo ilustrativo das etapas do processo de separação por troca iônica.....	27

CAPÍTULO II

Figura 2.1 Cromatograma de eluição da protease produzida por <i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634 na cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50.....	46
Figura 2.2 Estabilidade ao NaCl da protease de <i>Aspergillus tamarii</i> URM 4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.....	48
Figura 2.3 Gráfico de Pareto de efeitos de variáveis na atividade proteásica da protease de <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.....	50
Figura 2.4 Gráfico de Pareto de efeitos de variáveis na atividade collagenolítica da protease de <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.....	51
Figura 2.5 Perda de água da carne bovina após 72h de tratamento a 4° C com diferentes enzimas.....	52
Figura 2.6 Índice de Fragmentação Miofibrilar Relativo nos diferentes tratamentos da amostra cárnea com proteases.....	54

Figura 2.7 Análise SDS-PAGE dos Padrões de Digestão Miofibrilar tratadas com protease purificada e papaína em água destilada a 37°C durante 1h.....	55
Figura 2.8 Padrão de digestão miofibrilar da protease purificada de <i>Aspergillus tamaraii</i> URM4634 em diferentes tempos a 4°C.....	56
Figura 2.9 Padrão de digestão miofibrilar da protease de <i>A. tamaraii</i> purificada em diferentes tempos a 37°C.....	57
Figura 2.10 Imagens de microscopia de luz de amostras de bovinos com resolução de 100x: secção longitudinal do controle (A); corte longitudinal de amostra tratada com extrato bruto (B); corte longitudinal de amostra tratada com protease purificada (C); Seção longitudinal de amostra tratada com papaína comercial.....	59
Figura 2.11 Imagens de microscopia de luz de amostras de bovinos com resolução de 40x: secção longitudinal do controle (A); corte longitudinal de amostra tratada com extrato bruto (B); corte longitudinal de amostra tratada com protease purificada (C); Seção longitudinal de amostra tratada com papaína comercial.....	59

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO I

Quadro 1.1 Classificação de proteases de acordo com o sítio catalítico ativo.....	18
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 2.1 Níveis dos fatores do Planejamento fatorial completo 2^2 para caracterização bioquímica da protease de <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.....	42
Tabela 2.2 Resultado da Cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 para a protease precipitada por acetona com eluição em 0,5 M de NaCl.....	46
Tabela 2.3: Resultados do Planejamento Fatorial completo 2^2 para caracterização bioquímica da protease de <i>Aspergillus tamarii</i> URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.....	48
Tabela 2.4: Resultados do índice de Fragmentação Miofibrilar em diferentes tratamentos da amostra cárnea com proteases.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AE – Atividade Específica

AP – Atividade. Proteásica

BDA – Batata Dextrose Ágar

BSA – Albumina de Soro Bovino

CRA – Capacidade de Retenção de Água

FDA – Food and Drug Administration

FES – Fermentação em Estado Sólido

FP – Fator de Purificação

F_{Sm} – Fermentação submersa

HMW – Padrão de alto peso molecular

IFM – Índice de Fragmentação Miofibrilar

kDa – Kilodalton

LMW – Padrão de baixo peso molecular

P₀ – Peso da carne crua

P₁– Peso da carne após o tratamento enzimático.

pH – Potencial Hidrogeniônico

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida

TCA – Ácido Tricloroacético

TP – Teor de Proteína

Y – Recuperação.

RESUMO

A biotecnologia enzimática está inserida em um dos cenários mais promissores quando se trata de produção, purificação e aplicação de moléculas de alto valor agregado, como as enzimas. As proteases pertencem a um grupo específico de enzimas que são capazes de catalisar reações hidrolíticas, o que resulta na clivagem de proteínas em moléculas de peso molecular menores como aminoácidos e peptídeos. Uma das fontes de obtenção de proteases é por meio dos micro-organismos em que nas etapas de produção envolvem os processos de *upstream* e *downstream*. A Fermentação em Estado sólido (FES) é uma operação intermediária desses processos, e pode ser conduzida com a utilização de fungos filamentosos como o *Aspergillus tamarii*. Através desses processos aliado a uma etapa de purificação pode-se obter as collagenases que são responsáveis pela hidrólise das ligações dos peptídeos do colágeno nativo e desnaturado. Dentre suas principais aplicações está o amaciamento de carnes. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo a produção de proteases com atividade collagenolítica por FES, bem como sua purificação por cromatografia de troca iônica para posterior avaliação de seu potencial na tenderização de carnes. A protease obtida apresentou uma atividade collagenolítica de 296,6 U/mL e apresentou uma purificação de 6,28 vezes. O processo de tenderização apresentou forte eficiência da enzima ao degradar as proteínas miofibrilares observado pelo alto Índice de Fragmentação Miofibrilar (250,8) correspondendo a uma Fragmentação Relativa de 292,0%. Os resultados obtidos demonstram a grande potencialidade da collagenase obtida de *Aspergillus tamarii* em ser usada como amaciante cárneo.

Palavras-chaves: Proteases, collagenases, purificação, tenderização de carnes.

ABSTRACT

Enzymatic biotechnology is one of the most promising scenarios when it comes to the production, purification and application of high value-added molecules, such as enzymes. Proteases belong to a specific group of enzymes that are capable of catalyzing hydrolytic reactions, which results in the cleavage of proteins into smaller molecular weight molecules such as amino acids and peptides. One of the sources of protease production is through the microorganisms that in the production stages involve upstream and downstream processes. Solid State Fermentation (SSF) is an intermediate operation of these processes, and can be conducted with the use of filamentous fungi such as *Aspergillus tamarii*. Through these processes, together with a purification step, the collagenases can be obtained which are responsible for the hydrolysis of the bonds of the native and denatured collagen peptides. Among its main applications is the softening of meats. In view of the above, the present study had the production of proteases with collagenolytic activity by SSF, as well as its purification by ion exchange chromatography for further evaluation of its potential in the tenderization of meats. The protease obtained showed a collagenolytic activity of 296.6 U/mL and presented purification factor of 6.28 fold. The tenderization process showed the strong efficiency of the enzyme to degrade the myofibrillar proteins noticed by the high Myofibrillar Fragmentation Index (250.8) corresponding to a Relative Fragmentation of 292.0%. The results obtained demonstrate the great potentiality of the collagenase obtained from *Aspergillus tamarii* to be used as a meat tenderizer.

Key words: Proteases, collagenases, purification, meat tenderization.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS E QUADROS	III
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Geral.....	17
2.2 Específicos	17
CAPÍTULO I	18
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1 Proteases	18
3.1.1 Fontes de obtenção das Proteases	20
3.1.2 Colagenases	21
3.2 Produção de enzimas	23
3.2.1 Processos de fermentação biotecnológica.....	23
3.3 Métodos de concentração e purificação para proteases com atividade colagenolítica ...	25
3.3.1 Precipitação.....	25
3.3.2 Cromatografia de troca iônica.....	26
3.4 Aplicações industriais das proteases com atividade colagenolítica.....	27
3.4.1 Tenderização de carnes	28
4. REFERÊNCIAS	30
CAPÍTULO II.....	36
RESUMO.....	36
ABSTRACT	37
1. INTRODUÇÃO	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 Micro-organismos	40
2.2 Preparação do inóculo.....	40
2.3 Substrato para fermentação.....	40
2.4 Produção de protease colagenolítica por fermentação em estado sólido	40
2.5 Extração da enzima	41

2.6 Determinação de atividade proteásica	41
2.7 Determinação da atividade colagenolítica	41
2.8 Determinação do teor de proteína	42
2.9 Precipitação cetônica	42
2.10 Purificação por cromatografia de troca iônica	42
2.11 Estabilidade em Cloreto de Sódio (NaCl).....	43
2.12 Planejamento fatorial completo 2 ² da caracterização para avaliação dos efeitos de pH e temperatura nas atividades proteásica e colagenolítica	43
2.13 Aplicação da protease purificada na tenderização de carnes	43
2.14 Capacidade de Retenção de Água (CRA)	44
2.15 Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM)	44
2.16 Padrão de Digestão Miofibrilar.....	45
2.17 Análise histológica.....	45
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Produção de protease colagenolítica por fermentação em estado sólido	45
3.2 Purificação por cromatografia de troca iônica	46
3.3 Estabilidade da protease purificada em NaCl	48
3.4 Planejamento Fatorial completo 2 ² para caracterização bioquímica da atividade enzimática	49
3.5 Aplicação da protease purificada na tenderização de carnes	52
3.5.1 Capacidade de Retenção de Água (CRA).....	52
3.5.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM)	53
3.5.3 Padrão de digestão miofibrilar	55
3.5.4 Análise histológica.....	58
4. CONCLUSÕES	60
5. REFERÊNCIAS	61
ANEXO A - CAPA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i>.....	66

1. INTRODUÇÃO

O campo da biotecnologia enzimática está inserida em um dos cenários mais promissores quando se trata de produção, purificação e aplicação de moléculas de alto valor agregado, como as enzimas. Em razão de sua especificidade e seletividade sobre substratos, as enzimas se destacam quando comparadas aos catalisadores químicos convencionais e por isso vêm sendo utilizadas em processos biotecnológicos e industriais apresentando grande participação no comércio mundial. Estima-se que o mercado global de enzimas expanda em média 4,6% passando de um faturamento anual de US\$ 5,78 em 2015 para US\$ 7,2 bilhões em 2020 (SILVA, 2011; FISCHER et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2017).

As proteases pertencem a um grupo específico de enzimas que são capazes de catalisar reações hidrolíticas o que resulta na clivagem de proteínas em moléculas de peso molecular menores como aminoácidos e peptídeos (SHARMA et al., 2017). Quanto às fontes, as proteases podem ser extraídas de materiais vegetais (papaína, bromelina, ficina), animais (peptidases digestivas) e pela via microbiana, sendo esta última a que apresenta uma maior relevância industrial por ser a principal fonte de produção em razão de suas vantagens técnicas como possibilidade de produção em larga escala e econômicas pela alternativa de uso de resíduos agroindustriais (AGUILAR e SATO, 2018).

A obtenção de proteases por micro-organismos se dá por meio de um processo fermentativo, envolvendo etapas anteriores (*upstream*) e posteriores (*downstream*) à esse processo. As operações de *upstream* se relacionam ao pré-tratamento da matéria-prima e tem como objetivo fornecer as condições ideais ao sistema fermentativo; e operações de *downstream* estão relacionadas com a obtenção do produto após a fermentação, incluindo etapas de separação e purificação do material resultante (MONTEIRO e SILVA, 2009).

Dos processos fermentativos utilizados para obtenção de proteases por via microbiana pode-se citar a Fermentação Submersa (FSm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES). O modo como a enzima será obtida é um dos fatores determinantes que influenciam no rendimento da produção, características intrínsecas do extrato enzimático, entre outros. A FES, tem se destacado quando comparada à FSm, pela possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substrato, além disso, atua em um teor reduzido de água o que representa vantagem principalmente quando se trata de uma fonte microbiana fúngica, produzindo metabólitos de forma concentrada o que facilita sua recuperação (OLIVEIRA e RODRIGUES, 2016).

Os micro-organismos que podem ser utilizados para obtenção de proteases incluem, fungos, bactérias e leveduras, no entanto as proteases fúngicas apresentam algumas vantagens, dentre as quais, a facilidade de remoção do micélio, podendo-se obter um extrato livre de células, além da capacidade de crescimento em ambientes sob as mais diversas condições com variações em tempo, temperatura, pH e nutrientes do bioprocessamento (HAMIN-NETO, 2012; ANDRADE et al., 2002). No presente estudo, as proteases foram produzidas por fungo filamentoso *Aspergillus tamarii* em bioprocessamento sólido. O gênero *Aspergillus* é largamente encontrado na natureza e apresenta boas propriedades de fermentação, além de sintetizarem altos níveis de proteína. A espécie *A. tamarii*, destaca-se por ser uma das cepas é consideradas seguras pela Food and Drug Administration (FDA), em razão da não-toxicidade da espécie (SILVA, 2016; BAKKER, 2017).

O extrato bruto enzimático obtido na fermentação além da proteína de interesse pode apresentar substâncias que atuam como contaminantes e inibidores, necessitando de sua remoção através de processos de pré-purificação e purificação a fim de oferecer uma protease com maior grau de pureza e especificidade, dando condições para aplicações posteriores (PADILHA, 2010).

Dentre as proteases que podem ser obtidas através da fermentação utilizando fungos filamentosos seguido de um processo de purificação, estão as collagenases. Estas são enzimas específicas responsáveis pela hidrólise das ligações dos peptídeos do colágeno nativo e desnaturado. Diversas aplicações industriais têm sido reportadas com essas enzimas nas áreas químicas, farmacêuticas e de alimentos. Uma aplicação em destaque é sua utilização na tenderização de carnes a fim de obter uma matriz cárnea com sabor e textura mais palatáveis para os consumidores (BENITO et al., 2002; SILVEIRA, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Produzir e purificar proteases com atividade collagenolítica por Fermentação em Estado Sólido para aplicação no amaciamento de carnes.

2.2 Específicos

- ❖ Produzir proteases com atividade collagenolítica de *Aspergillus tamarii* URM 4634 por Fermentação em Estado Sólido;
- ❖ Purificar as proteases obtidas por cromatografia de troca-iônica;
- ❖ Avaliar a estabilidade da protease purificada na presença de cloreto de sódio;
- ❖ Realizar o planejamento fatorial completo 2^2 com a protease purificada para testar os efeitos do pH e temperatura nas atividades proteásica e collagenolítica;
- ❖ Realizar a aplicação da protease purificada no amaciamento de carnes.

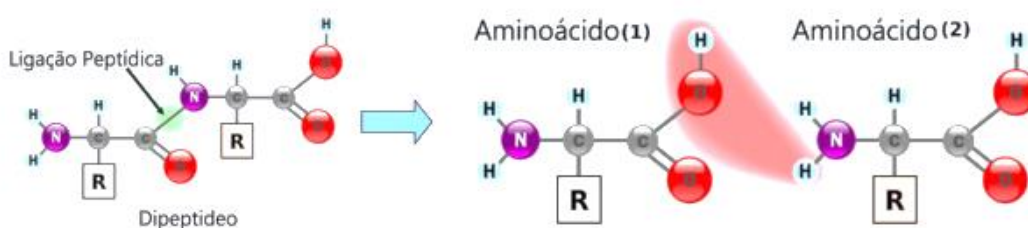
CAPÍTULO I

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Proteases

As proteases ou peptidases são um grupo de enzimas capazes de catalisar a reação hidrolítica de ligações peptídicas originando peptídeos de tamanhos variáveis ou aminoácidos livres conforme ilustrado na Figura 1.1 (SILVEIRA, 2015). Essas enzimas estão envolvidas em diversas funções biológicas complexas, sendo a hidrólise proteica a principal dessas funções, além disso fazem parte dos mecanismos de digestão, ativação enzimática, coagulação sanguínea e transporte de proteínas através da membrana (FREITAS, 2013).

Figura 1.1 Mecanismo ilustrativo da hidrólise de uma ligação peptídica e seus produtos finais. (Fonte: SOUZA, 2015)



As proteases podem ser classificadas de acordo com o mecanismo de ação e inicialmente recebem o nome de hidrolases devido ao processo de reação do substrato (peptídeos) com a água disponível no meio reacional, pertencendo assim à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). Além disso, por apresentar uma grande diversidade de ação e estrutura podem ainda ser subdivididas baseando-se no tamanho molecular, propriedades elétricas, especificidade ao substrato e modo de ação (NASCIMENTO, 2005; FREITAS, 2013).

A classificação segundo o modo de ação é baseada na posição da ligação peptídica a ser clivada, desse modo as proteases podem ser endopeptidases (EC. 3.4. 21-99) e exopeptidases (E.C. 3.4.11-19). As endopeptidases são enzimas que atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal, já as exopeptidases clivam apenas o final da cadeia essencialmente na região N ou C terminal, assim removendo apenas um aminoácido, dipeptídeo ou tripeptídeo de uma ou outra região terminal (SOUZA, 2015). As exopeptidases são ainda divididas de acordo com a região que atuam, assim são denominadas de aminopeptidases quando agem na região N-terminal da

cadeia proteica e carboxipeptidases quando atuam na região C-terminal. Estas últimas são classificadas de acordo com os grupos químicos do centro-ativo da enzima, dessa forma as carboxipeptidases podem ser subdivididas em serina-, metalo- e cisteína-carboxipeptidases. As endopeptidases, por sua vez, são classificadas em serina-, cisteína-, aspártico-, metalo- e treonina-endopeptidases conforme Quadro 1.1 (SILVA, 2013).

Quadro 1.1 Classificação de proteases de acordo com o sítio catalítico ativo. (Fonte: SILVA, 2013).

Peptidases	EC subclasses
Carboxipeptidases	
Serina-carboxipeptidase	3.4.16
Metallo-carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína-carboxipeptidase	3.4.18
Endopeptidases	
Serina-endopeptidase	3.4.21
Cisteína-endopeptidase	3.4.22
Aspártico-endopeptidase	3.4.23
Metallo-endopeptidase	3.4.24
Treonina-endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecido	3.4.99

A classificação das proteases ainda pode se dar em função do seu pH ótimo de atuação, ou seja, na faixa de pH em que a enzima apresenta os maiores valores de atividade, assim elas são divididas em proteases ácidas, alcalinas ou neutras. Dentre as ácidas, pode-se citar principalmente as aspártico-proteases que apresentam melhores atividades na faixa de pH entre 2,0 e 6,0. Na região da neutralidade (pH entre 6,0 e 8,0) estão as peptidases neutras como as cisteína-proteases, metalo-proteases e algumas serino-proteases. Por fim, as proteases básicas possuem faixa de pH ideal para sua atividade entre 8,0 e 13,0 e dentro desse grupo pode-se destacar as serino-proteases. O entendimento da classificação e das especificidades de cada protease são aspectos essenciais para definir melhor as condições das aplicações industriais (FELIX; NORONHA; MARCO, 2004).

3.1.1 Fontes de obtenção das Proteases

As proteases podem ser obtidas de origem animal, vegetal e microbiana. De acordo com a fonte envolvida, as proteases assumem características diferentes, com especificidades distintas, sendo imprescindível o conhecimento dessas propriedades para melhor direcionar as aplicações industriais.

As proteases de origem vegetal são dependentes de fatores como viabilidade do solo para o cultivo e a suscetibilidade de condições climáticas que promovam o crescimento das plantas. As principais proteases obtidas de plantas relatadas na literatura são papaína, bromelina e ficina. A papaína é extraída do látex do mamão, atuam sobre o colágeno e elastina, que constituem o tecido conjuntivo, tendo pouca atuação sobre as fibras musculares. Sua melhor faixa de atuação apresenta-se em pH entre 5 e 9 e temperaturas entre 80 a 90°C. A bromelina possui propriedades semelhantes à papaína, é extraída do abacaxi e apresenta funções de uma cisteína-protease com faixa de atuação em pH de 5 a 9 e temperatura de inativação em 70°C. Menos requisitada que a papaína e bromelina, a ficina é extraída do látex do *Ficus sp* e possui indicações análogas às proteases discutidas anteriormente, apresenta estabilidade em valores de pH entre 6 e 8 e apresentam especificidade por uma vasta gama de substratos como a gelatina, colágeno, proteínas do leite, hemoglobina, elastina, proteínas de soja, fibrina e fibrinogênio. Essas proteases são geralmente mencionadas no processo de amaciamento de carnes (RAO et al., 1998; EVANGELISTA, 2001; NASCIMENTO, 2005).

As proteases de origem animal são dependentes da disponibilidade de animais vivos que são ainda regulamentados por políticas agropecuárias e governamentais. As proteases animais que recebem maior destaque são a tripsina pancreática, a quimiotripsina e a renina. A tripsina é extraída do sistema digestivo dos animais, é uma serino-protease que hidrolisa as cadeias peptídicas no grupamento carboxílico formado por resíduos de lisina e arginina e possui aplicação limitada na indústria de alimentos pela formação de hidrolisados de sabor amargo. As quimiotripsinas são obtidas do extrato pancreático dos animais e são utilizadas eventualmente em aplicações analíticas, em razão de seu alto preço. Uma das proteases animais mais utilizadas é a renina ou quimosina que hidrólisa a ligação peptídica entre fenilalanina e metionina da K-caseína, extraída do abomaso de bovinos antes do desmame e são frequentemente relatadas em aplicações que envolvem a coagulação do leite para fabricação de derivados como queijo (NASCIMENTO, 2005).

Em razão dos obstáculos apresentados para a produção em larga escala das proteases de origem vegetal e animal, de forma que apresente um custo reduzido e se dê de forma

sustentável, as enzimas de origem microbiana se sobressaem em termos de viabilidade de produção, por serem obtidas através de processos mais simples, rápidos e com custos relativamente menores, e ainda na maioria das vezes apresentam estabilidade maior que às homólogas de animais e vegetais (FREITAS, 2013; GIONGO, 2006).

Devido sua grande diversidade bioquímica e suscetibilidade à manipulação genética, os micro-organismos fazem parte de uma ótima fonte de enzimas, permitindo grande rendimento por meio da fermentação. As proteases podem ser encontradas em diversos gêneros microbianos como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos (FEDATTO, 2004). Majoritariamente, as proteases microbianas industriais são provenientes de várias espécies fúngicas filamentosas, como *Mucor* sp., *Pennicillium* sp., *Rhizopus* sp. e *Aspergillus* sp. em virtude de produzirem enzimas em grande quantidade e variedade, além de se adaptarem bem aos substratos sólidos, já que fazem parte de seu habitat natural, apresentando assim uma excelente capacidade de fermentação (PEREIRA, 2014).

De acordo com Lima (2012), as espécies mais estudadas dos fungos filamentosos pertencem ao gênero *Aspergillus* spp., que podem ser largamente encontrados na natureza, principalmente em solos. Esse gênero representa uma área de interesse para biotecnologia em virtude de sintetizarem altos níveis de proteína, possuírem boas propriedades para fermentação o que permite a produção em larga escala. Além disso, algumas cepas do gênero *Aspergillus*, como o *Aspergillus tamarii*, são considerados seguros pela Food and Drug Administration (FDA), em razão da não-toxicidade da espécie, possibilitando o seu uso aplicações em alimentos e dietas alimentares (SILVA, 2016; BAKKER, 2017).

3.1.2 Colagenases

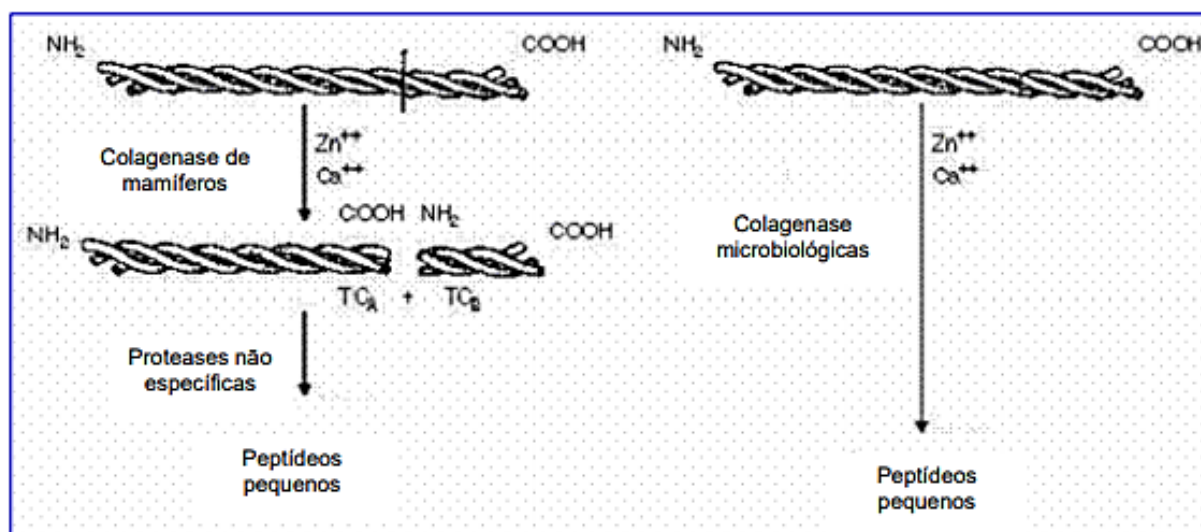
Dentre as proteases que podem ser obtidas pelos fungos filamentosos, estão as colagenases, que fazem parte de um grande grupo de enzimas de importância vital, principalmente do ponto de vista fisiológico, já que exibe influência na manutenção e regeneração de órgãos e tecidos (SILVEIRA, 2015). Estas enzimas que apresentam propriedades colagenolíticas são capazes de degradar as ligações peptídicas de diversos tipos de colágeno (nativo ou desnaturado), além outros tipos de proteínas. As colagenases têm demonstrado grande importância comercial na medicina humana e veterinária, além de serem frequentemente relatadas em aplicações alimentícias (RAO et al., 1998; WATANABE, 2004; LIMA et al., 2015; WANDERLEY et al., 2016).

O colágeno faz parte de uma família de proteínas fibrosas que se fazem presentes em todos os organismos multicelulares. É caracterizado por formar fibras insolúveis que

apresentam uma enorme força de tensão. A unidade básica estrutural do colágeno é denominada tropocolágeno, que apresenta um peso molecular em torno de 285 kDa e se forma através da junção de três cadeias polipeptídicas dos aminoácidos glicina, prolina, lisina, hidroxilisina, hidroxiprolina e alanina. Essas cadeias possuem o mesmo tamanho em formato helicoidal, sendo duas α -cadeias e uma β -cadeia interligadas para formar a tripla hélice do colágeno, responsável por proporcionar resistência e elasticidade à estrutura (FERREIRA JUNIOR, 2006; SILVA e PENNA, 2012).

As collagenases podem ser obtidas de vegetais, animais e micro-organismos. Assim, como já discutido para as proteases, a fonte microbiana têm sido mais estudada, já que as collagenases oriundas de vegetais contam com limitações de disponibilidade de solo, condições climáticas, etc., e as proteases de fontes animais possuem a capacidade de clivar somente o colágeno nativo, ou seja, são proteases que apenas hidrolisam a cadeia helicoidal do colágeno, dando origem a dois fragmentos, o TC_A e o TC_B tropocolágeno que são acessíveis à proteases específicas, diferentemente das collagenases microbianas que são capazes de hidrolisar tanto o colágeno nativo quanto o desnaturado, onde os produtos dessa hidrólise são os pequenos peptídeos, conforme ilustra a Figura 1.2 (FERREIRA JUNIOR, 2006). Assim, as collagenases microbianas por demonstrarem afinidade em diversos sítios ao longo da cadeia do colágeno, representam uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas.

Figura 1.2 Mecanismo comparativo da ação das collagenases de origem animal e collagenases microbianas. (Fonte: FERREIRA JUNIOR, 2006).

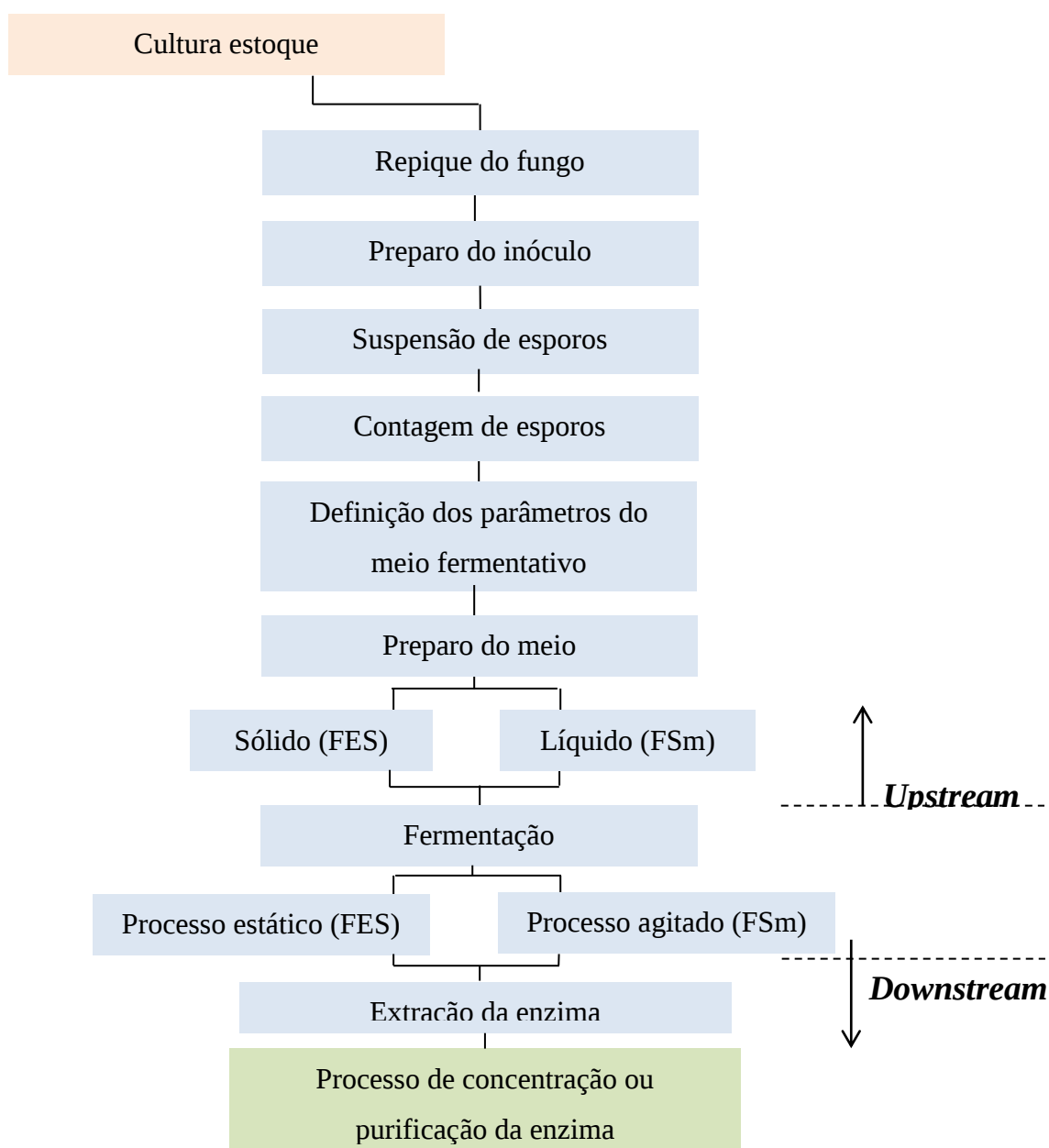


3.2 Produção de enzimas

3.2.1 Processos de fermentação biotecnológica

O processo de fermentação industrial é compreendido pelo crescimento microbiano em condições aeróbicas ou anaeróbicas com os parâmetros físico-químicos determinados e controlados. Tecnologicamente, a fermentação é entendida como um processo que permite a biotransformação ou síntese de uma substância a partir de um substrato pela ação de um micro-organismo (ROVEDA, 2010). A Figura 1.3 apresenta um esquema geral do processo de fermentação e obtenção de produtos.

Figura 1.3 Etapas de um processo de produção de enzimas por meio de fermentação. (Fonte: O autor, 2018).



A produção de proteases se dá principalmente através de dois modos de fermentação, a Fermentação Submersa (FSm) e a Fermentação em Estado Sólido (FES), em que a escolha do tipo de fermentação e do meio a serem utilizados determinará as características da produção e dos produtos finais já que cada micro-organismo apresenta suas melhores condições para produção máxima de enzimas (SILVA, 2011; HAMIN-NETO, 2012).

A FSm caracteriza-se por um meio líquido cujo nutrientes são dissolvidos, o que permite um maior controle das condições fermentativas como temperatura, pH, aeração e agitação do meio de cultura, além de possibilitar uma distribuição uniforme tanto dos nutrientes quanto dos micro-organismos (SINHA e SINHA, 2009). No entanto, apresenta como desvantagens a demanda por requerimento energético e hídrico, o que consequentemente encarece esse processo pela necessidade de constante aeração e agitação (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

A FES é entendida como um processo em que o crescimento do micro-organismos ocorre em meio sólido na ausência quase que total de água livre, sendo necessário que o substrato se apresente suficientemente umedecido a fim de que suporte o crescimento e metabolismo microbiano (SILVA, 2011). Apesar de apresentar uma possibilidade de acesso ao substrato menor e ser mais difícil de controlar as variáveis envolvidas, este método de fermentação se sobressai em relação ao submerso pelo baixo requerimento energético, menor gasto hídrico, pela simplicidade do meio de cultivo que possibilita a utilização de resíduos agroindustriais como substrato, além disso, por ser realizado em meio de baixa umidade, diminui o risco de contaminação (BAKKER, 2017). Em razão das condições do bioprocessos, a FES favorece à utilização de fungos filamentosos em relação à bactérias, já que atua com baixa umidade do meio, o que contribui para a expansão de pesquisas relacionadas ao estudo de espécies de fungos provenientes do solo brasileiro (ZHANG et al., 2013).

De acordo com a literatura, o substrato trata-se de um suporte sólido, que atua como fonte de nutrientes. Conforme já mencionado, a FES permite a reutilização dos resíduos agroindustriais, dentre eles, as cascas de frutas, resíduos de café, bagaço de cana, farelos de soja, aveia e trigo, entre outros. O substrato farelo de trigo foi reportado diversas vezes para produção de proteases (SILVA, 2011; ZANPHORLIN et al., 2011; ANDRADE, PINTO e FREITAS, 2014) e colagenases (JAIN; JAIN, 2010; SILVA et al., 2016a)

O farelo de trigo consiste da parte mais externa do grão de trigo e é resultante da produção de farinha de trigo. Para aplicação em bioprocessos, o farelo de trigo se apresenta como um subproduto de interesse pois em relação aos meios de cultura sintéticos apresenta

baixo valor agregado e possui uma forte heterogeneidade química por ser rico em carboidratos (50,4 – 79,1%), proteínas (13,5 – 18,4%) , gorduras (2,6 – 3,4%) e minerais (2,7 – 6,1%). Além disso, possui baixo teor de lignina (menor que 5%) o que o diferencia das demais biomassas lignocelulósicas (bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz e farelo de soja) que apresentam valores maiores desse componente que é de difícil solubilização e potencialmente geradora de inibidores para o crescimento microbiano (EVERS; MILLAR, 2002; PANDEY et al., 2011; PRÜCKLER et al., 2014).

3.3 Métodos de concentração e purificação para proteases com atividade collagenolítica

3.3.1 Precipitação

O produto resultante da fermentação é constituído além da molécula de interesse por outras substâncias que podem exercer influência sobre a protease atuando como contaminantes e inibidores o que possivelmente acaba reduzindo a atividade da enzima. Portanto, para aumentar a concentração da molécula alvo e eliminar seus contaminantes, utiliza-se previamente a técnica da precipitação, que funciona como uma pré-purificação, atuando de maneira rápida e eficiente (SILVEIRA, 2015).

A precipitação pode se dar basicamente utilizando altas concentrações de sal ou um solvente orgânico. A precipitação por sais utiliza as propriedades de força iônica, já que o meio utilizado (sal) promove a desidratação da proteína que se torna insolúvel, no entanto, essa técnica mostra uma baixa seletividade e pode provocar corrosão nos equipamentos. Dentre os sais mais utilizados estão o sulfato de sódio e sulfato de amônio (SANT'ANNA JÚNIOR, 2001).

A precipitação por solvente orgânicos é a que apresenta maiores aplicações em termos industriais em virtude de oferecer resultados favoráveis de rendimento e uma seletividade considerada mediana. A adição de um solvente como acetona, etanol ou metanol acarreta na redução da constante dielétrica da solução em trabalho, o que diminui sua solubilidade e promove a associação das moléculas por meio de interações eletrostáticas. Essa técnica requer cuidados em virtude da facilidade da desnaturação proteica, por isso deve acontecer em baixas temperaturas e a adição e mistura do solvente deve ser dada de forma lenta (ABRAHÃO NETO, 2001).

3.3.2 Cromatografia de troca iônica

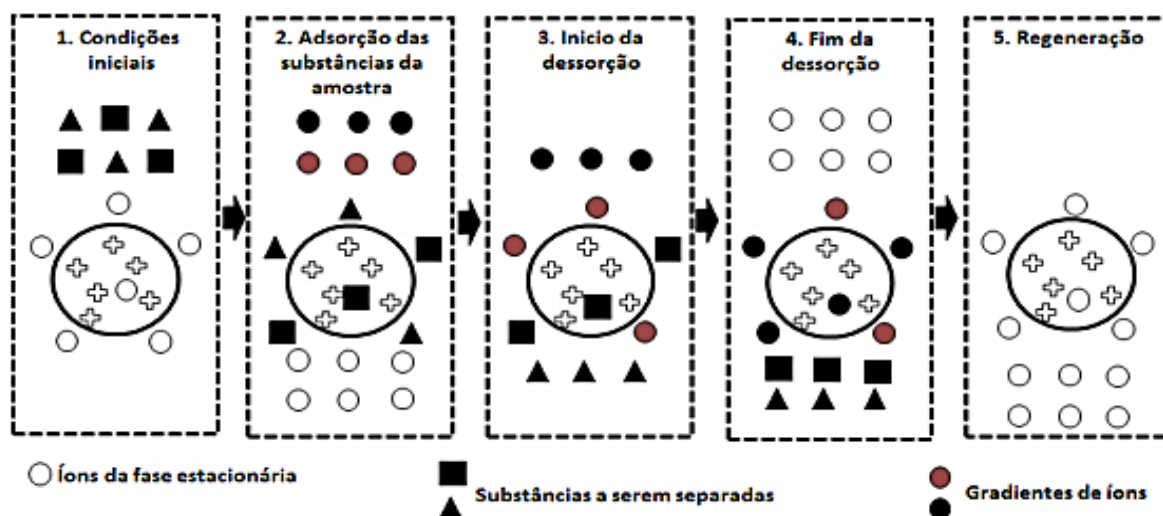
Para que a enzima apresente um grau maior de pureza é necessário o emprego de técnicas cromatográficas, que envolve uma gama de possibilidades como cromatografia de troca-iônica, por exclusão molecular, por afinidade, entre outras, e sua escolha dependerá das propriedades e características da protease, bem como do grau de pureza demandado pelo tipo de aplicação que será realizado posteriormente (SILVEIRA, 2015). De forma geral, a cromatografia é entendida como um método de purificação que se baseia na separação diferencial dos componentes de uma mistura, e se dá em razão das diferentes interações entre as duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2007).

Conforme já mencionado, a precipitação trata-se de uma etapa de pré-purificação que nesse caso antecede à cromatografia. Após a concentração da enzima promovida pela precipitação, são então aplicados métodos capazes de explorar as interações eletrostáticas das proteases, como a cromatografia de troca iônica (ABRAHÃO NETO, 2001).

A cromatografia de troca iônica, especificamente, ocorre por meio de um mecanismo de retenção de íons em uma fase estacionária (resina) altamente carregada de grupos ionizáveis, cátions ou ânions. Para promover a interação o soluto da fase móvel deve possuir cargas de sinais contrários à fase estacionária. Geralmente, a fase móvel é constituída por uma solução iônica tamponante que apresente compatibilidade pelo grupo funcional ionizável (ABRAHÃO NETO, 2001; BERG, TYMOCZKO & STRYER, 2007).

No esquema a seguir (Figura 1.4) ilustra-se o mecanismo de separação que elucida a troca iônica como método de purificação. No primeiro estágio é possível observar o equilíbrio existente entre os trocadores iônicos. O segundo estágio é onde se inicia a adsorção da amostra, ou seja, o conteúdo que deseja purificar é injetado na coluna cromatográfica, onde ocorre a liberação de íons da fase estacionária na mesma quantidade em que a amostra é adsorvida. O início da dessorção acontece no terceiro estágio pela troca do eluente e aumento no gradiente de sal, que enfraquece as ligações eletrostáticas entre soluto e fase estacionária promovendo a remoção das substâncias de interesse (YAGINUMA, 2007).

Figura 1.4: Mecanismo ilustrativo das etapas do processo de separação por troca iônica. (Fonte: ARCANJO, 2014).



Os quarto e quinto estágios relacionam-se com a finalização do processo de purificação em que é feita a remoção das substâncias que não foram eluídas anteriormente, assim como o reequilíbrio dos trocadores, que se trata da regeneração da coluna (YAGINUMA, 2007).

Na cromatografia de troca iônica, as matrizes da fase estacionária usualmente são resinas poliméricas de alto peso molecular que contenham grupos iônicos como integrantes da estrutura do polímero. Essas resinas estão diretamente relacionadas com a grande vantagem de se utilizar a troca iônica pelo fato de poderem ser regeneradas a com solução iônica previamente presente no polímero, revertendo a reação de equilíbrio.

3.4 Aplicações industriais das proteases com atividade collagenolítica

As melhorias nas técnicas de produção e purificação de proteases possibilitaram que essas enzimas pudessem ser utilizadas numa ampla gama de aplicações. Em termos industriais, as proteases que apresentam atividade collagenolítica podem ser utilizadas em inúmeras etapas do processo produtivo, caracterizando-se como uma alternativa viável nos segmentos terapêutico, têxtil e alimentício (OLIVEIRA, 2017).

De acordo com Watanabe (2004), as collagenases podem ser subdivididas em duas categorias baseando-se no método de utilização: (1) aquelas que são administradas diretamente como soluções tópicas por meio de pomadas e (2) aquelas em que o que são utilizados são os produtos resultantes da sua ação, mais comum em aplicações alimentícias.

No âmbito terapêutico sua utilização relaciona-se com o tratamento de diversas doenças como Doença de Peyronie (JORDAN, 2008), Doença de Dupuytren (WATT et al., 2010), escaras, cicatrizes pós-operatórias, psoríase (ERDEVE et al., 2007), entre outras.

Por se apresentarem como biocatalisadores atóxicos e ecologicamente compatíveis, as collagenases têm sido aplicadas com o intuito de promover uma maior absorção da tintura em couros, diminuindo assim a quantidade de corante de tingimento de tecidos descartado no meio ambiente (KANTH et al., 2008).

Na indústria alimentícia as collagenases são usualmente empregadas nos segmentos de pescado e carnes, sendo adicionadas nas etapas de beneficiamento dos produtos. No processamento do pescado a sua ação ocorre na musculatura do peixe, facilitando as etapas da remoção da pele e extração do colágeno. Já no beneficiamento de carnes, as collagenases atuam no processo de amaciamento, uma vez que o colágeno insolúvel está relacionado com a resistência da carne, assim a protease age no processo de separação do tecido conectivo, contribuindo para o aumento da qualidade do produto (OLIVEIRA, 2017).

3.4.1 Tenderização de carnes

A principal proteína do endomísio e perimísio é o colágeno, que de acordo com o tipo de músculo pode variar em termos de tipo e quantidade, influenciando diretamente nas variações de maciez dos cortes e produtos cárneos. Nesse contexto, músculos com maior funcionalidade apresentam maior conteúdo de colágeno quando comparado à músculos que possuem uma demanda menor de esforço (TAYLOR, 2004).

A maciez da carne é um dos principais atributos considerados pelos consumidores como requisito para a qualidade da carne. A maciez depende entre outros fatores da extensão do sarcômero e da intensidade da degradação proteolítica (KEMP; PARR, 2012).

A literatura preconiza que o colágeno começa a encolher em temperaturas em torno de 60 a 70°C, pela quebra das ligações de hidrogênio, sendo em seguida solubilizados e convertidos em gelatina a 80°C e promovendo o amaciamento. No entanto, a eficiência da tenderização nesse caso vai depender do método de cocção utilizado, além disso, o aquecimento em temperaturas que promovam a ruptura do colágeno acaba acarretando em maiores perdas de umidade e endurecimento das proteínas miofibrilares, o que afeta a qualidade da carne. Para diminuir esses efeitos, a alternativa é a utilização das enzimas que apresentem atividades collagenolíticas como amaciante de carnes, e esse método tem sido considerado progressivo em termos de pesquisas (AKTAS, 2003).

Tem sido relatado a utilização de proteases collagenolíticas de *Aspergillus orizae* e *Bacillus subtilis*, sendo adicionadas à carne com o intuito de degradar as proteínas do músculo (actina e miosina), hidrolisar o colágeno e a elastina, contribuindo para o amaciamento da carne (KETNAWA e RAWDKUEN, 2011; HA et al., 2012). Assim, o presente trabalho visa compreender a ação de um novo tipo de protease collagenolítica obtida do fungo filamentoso *Aspergillus tamarii*.

4. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO NETO, J. Purificação de Enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed., cap.17, p. 377–390. 2001.
- AGUILAR, J. G. S; SATO, H. H. Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.
- AKTAS, N. The effects of pH, NaCl and CaCl₂ on thermal denaturation characteristics of intramuscular connective tissue. **Meat Science**, v. 407, p. 105- 112, 2003.
- ANDRADE, D. B.; PINTO, G. A. S.; FREITAS, A. C. Produção de proteases por *aspergillus oryzae* em fermentação semi-sólida utilizando farelo de trigo e canola. In: In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Anais eletrônicos**, Florianópolis-SC, 2014. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0469-25340-144575.pdf>> Acesso em: 25 de maio de 2018.
- ANDRADE, V. S.; SARUBBO, L. A.; FUKUSHIMA, K.; MIYAJI, M.; NISHIMURA, K.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production of extracellular protease by *Mucor Circinelloides* using D-glucose as carbon source / substrate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 106-110, 2002.
- BAKKER, C. M. C. N. **Avaliação da produção e aplicação de enzimas utilizando resíduo de farelo de trigo como substrato por fermentação em estado sólido**. 2017. 141f. Tese (doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.
- BENITO, M. J.; RODRIGUEZ, M.; NUNEZ, F.; ASENSIO, M. A.; BERMUDEZ, M. E. Purification and characterization of extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* active against meat protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3532-3536, 2002.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.. Bioquímica. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6 ed., 2007.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. 1. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

ERDEVE, O.; ATASAY, B.; ARSAN, S. Collagenase application for amputation in a preterm. **Pediatric Dermatology**, v. 24, p. 195-196, 2007.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. 2ª Ed. Editora Atheneu, São Paulo - S.P., 652p. 2001.

EVERS, T.; MILLAR, S. Cereal grain structure and development: some implications for quality. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 261–284, 2002.

FEDATTO, L. M. **Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira**. 2004. 67f. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases: características e aplicações industriais. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 115-129, 2004.

FERREIRA JUNIOR, D. L. **Deteção e caracterização parcial de collagenases obtidas de dermatófitos estocados na coleção de culturas micoteca URM**. 2006. 48f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Pernambuco . Recife.

FISCHER, J; LOPES, V. S.; SANTOS, E. F. Q.; GUIDINI, C. Z.; RAMADAN, L; FILHO, U.C.; CARDOSO, V. L. Purificação de complexo celulolítico de *aspergillus niger* usando sistema aquoso de duas fases com PEG-citrato. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 10, 2014, Florianópolis. **Anais eletrônicos**. Florianópolis: Universidade Federal de Uberlândia, 2014. Disponível em: <
<http://www.proceedings.blucher.com.br/article-details/purificao-de-complexo-celuloltico-de-aspergillus-niger-usando-sistema-aquoso-de-duas-fases-com-peg-citrato-16669>> Acesso em 15 de maio de 2018.

FREITAS, A. C. **Produção de extrato enzimático proteolítico por *Aspergillus oryzae* CCBP001 em reator instrumentado por fermentação semi-sólida**. 2013. 115f. Tese (doutorado), Universidade Federal do Ceará. Fortaleza.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 2006, 81f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

HA, M., BEKHIT, A. E. A., CARNE, A., & HOPKINS, D. L. Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. **Food Chemistry**, 134, 95–105. 2012.

HAMIN-NETO, Y. A. B. H. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***. 2012. 60 f. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Faculdade de ciências Farmacêuticas. Ribeirão Preto.

JAIN, R.; JAIN, P. C. Production and partial characterization of collagenase of *Streptomyces exfoliatus* CFS 1068 using poultry feather. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 174-178, 2010.

JORDAN, G. H. The use of intralesional clostridial collagenase injection therapy for Peyronie's disease: a prospective, singlecenter, non-placebo-controlled study. **J. Sexual Medicine**, v. 5, p. 180-187, 2008.

KANTH, S. V.; VENBA, R.; MADHAN, B.; CHANDRABABU, N. K.; SADULLA, S. Studies on the influence of bacterial collagenase in leather dyeing. **Dyes and Pigments**, v. 76, p. 338-347, 2008.

KEMP, C. M.; PARR, T. Advances in apoptotic mediated proteolysis in meat tenderisation. **Meat Science**, v. 92, p. 252– 259. 2012.

KETNAWA, S.; RAWDKUEN, S. Application of bromelain extract for muscle foods tenderization. **Food and Nutrition Sciences**, 2, 393–401. 2011.

LIMA, C. A.; CAMPOS, J. F.; LIMA FILHO, J. L.; CONVERTI, A.; da CUNHA, M. G. C.; PORTO, A. L. F. Antimicrobial and radical scavenging properties of bovine collagen hydrolysates produced by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 collagenase. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4459-4466. 2015.

LIMA, M. B. **Avaliação do efeito da adição de fontes nitrogenadas e de sais minerais na fermentação em estado sólido para produção de fitase por *Aspergillus***. 2012. 80f. Tese (Mestrado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MONTEIRO, V. N.; SILVA, R. N. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. **Revista processos químicos**, v. 3, n. 5, p. 9-23, 2009.

NASCIMENTO, W. C. A. **Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus* sp. Smia-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais.** 2005. 96f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense. Campos dos Goytacazes.

OLIVEIRA, A. C. D.; RODRIGUES, M. L. F. Produção, caracterização e aplicação de proteases de *penicillium* sp. obtidas por fermentação no estado sólido. Universidade Tuiuti do Paraná, p. 1-10, 2016.

OLIVEIRA, V. M.; CUNHA, M. N. C.; ASSIS, C. R. D.; NASCIMENTO, T. P.; HERCULANO, P. N.; CAVALCANTI, M. T. H.; PORTO, A. L. F. Colagenases do pescado e suas aplicações industriais. **Pubvet.** v.11, n.3, p. 243-255, Mar., 2017.

PADILHA, G. S. **Caracterização, purificação e encapsulamento de lipase de *Burkholderia cepacia*.** 2010, 142 f. Tese (doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PANDEY, A.; LARROCHE, C.; RICKE, C. S.; DUSSAP, C-G; GNANSOUNOU, E. Biofuels: alternative feedstocks and conversion processes. **Oxford: Elsevier**, 2011.

PEREIRA, J. L. **Produção de enzimas amilolíticas por *Aspergillus oryzae* através de fermentação no estado sólido.** 2014, 56f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade de Brasília, Brasília.

PRÜCKLER, M.; SIEBENHANDL-EHN, S.; APPRICH, S.; HÖLTINGER, S.; HAAS, C.; SCHMID, E.; KNEIFEL, W. Wheat bran-based biorefinery: Composition of wheat bran and strategies of functionalization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 56, n. 2, p. 211-221, 2014.

RAO, M.B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M.S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** p. 597-635. 1998.

ROVEDA, M.; HEMKEMEIER, M.; COLLA, L. M. Avaliação da produção de lipases por diferentes cepas de microrganismos isolados em efluentes de laticínios por fermentação submersa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 126-131, 2010.

SANT'ANNA JÚNIOR, G.L. Produção de Enzimas Microbianas. In: Lima, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. 1 ed. São Paulo, cap.14, p. 351–362. 2001.

SHARMA, K. M.; KUMAR, R.; PANWAR, S.; KUMAR, A. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, p. 115-126, 2017.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. 2013. 68f. Dissertação (mestrado), Universidade Católica de Pernambuco. Recife.

SILVA, O. S.; LAURENTINO, T. N. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S. Caracterização Parcial de Proteases por *Aspergillus tamarii* URM 4634 por Fermentação em Estado Sólido (FES). In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, **Anais eletrônicos**, Florianópolis-SC, 2014. Disponível em: <<http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0716-24311-175886.pdf>> Acesso em 17 de maio de 2018.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SOUZA-MOTTA, C. M. ; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, v. 4, p. 125-143, 2016.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* fresenius**. 2011. 60 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto.

SILVA, T. F.; PENNA, A. L. B. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. v. 3, ed. 71: p. 530-539, 2012.

SILVEIRA, L. L. **Purificação e caracterização de proteases com atividade collagenolítica produzida por *Actinomadura sp.*** 2015. 55 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the production of acid protease by submerged fermentation. **International Journal of food Engineering**, v. 5, 2009.

SOUZA, P. M. **Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. 2015. 125f. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo. São Paulo.

TAYLOR R. G. Connective tissue structure, function and influence on meat quality, In. **Encyclopedia of Meat Sciences**, p. 306-313, 2004.

WANDERLEY, M. C. A.; DUARTE NETO, J. M. W.; LIMA FILHO, J. L.; LIMA, C. A.; TEIXEIRA, J. A. C.; PORTO, A. L. F. Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. **Brazilian journal of microbiology**, p. 1-12, 2016.

WATANABE, K. Collagenolytic proteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 520-526. 2004.

WATT, A. J. CURTIN, C. M.; HENTZ, V. R. Collagenase injection as nonsurgical treatment of Dupuytren's disease. **Jornal of Hand Urgery**, v. 35, p. 534-539, 2010.

YAGINUMA, S.R. **Extração e purificação parcial de inulina a partir de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) por adsorção em resinas de troca iônica**. 2007. 76 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, ed. 11, p. 2137-2143, 2011.

ZHANG, X.; YUN, L.; PENG, L. Optimization of Douchi fibrinolytic enzyme production by statistical experimental methods. **Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical sciences**, v. 33, n. 1, p. 153–8, 2013.

CAPÍTULO II

PRODUÇÃO DE PROTEASES COM ATIVIDADE COLAGENOLÍTICA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA APLICAÇÃO NA TENDERIZAÇÃO DE CARNES

ALMEIDA, E. M.¹; SILVA, O. S.¹; PORTO, T. S.¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns.

Av. Bom Pastor s/n, 55296-901, Garanhuns – PE.

RESUMO

As proteases são enzimas responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas das moléculas proteicas e podem ser obtidas por via biotecnológica através da fermentação. As collagenases são proteases específicas em hidrolisar as ligações do peptídeo do colágeno e podem ser utilizadas na tecnologia de alimentos. O objetivo do presente trabalho foi produzir e purificar proteases com atividade collagenolítica por Fermentação em Estado Sólido para aplicação no amaciamento de carnes. Após as 72 h de FES com 5g de fibra de trigo, 40% de umidade a 30°C, a collagenase obtida apresentou uma atividade collagenolítica de 296,6 U/mL. A enzima purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A50 apresentou um fator de purificação de 6,28 vezes, uma atividade específica de 459,03 U/mg e uma recuperação de 45,4%. A atividade da protease mostrou um comportamento crescente entre as concentrações de 0,2 e 0,4 M de NaCl, com uma atividade residual máxima de 85,8% e atividade proteásica de 37,16 U/mL. Os resultados do planejamento fatorial demonstraram que tanto pH quanto temperatura foram significativos, e possuem efeitos negativos para atividade proteásica com melhores resultados em pH 8,0 e temperatura 40°C, enquanto que se mostraram não significativos para a atividade collagenolítica com maiores atividades em pH 9,0 e temperatura 50°C. A aplicação da protease no processo de tenderização de carnes demonstrou a forte eficiência da enzima ao degradar as proteínas miofibrilares da carne expressas na alta perda de água (15,75%), elevado Índice de Fragmentação Miofibrilar (250,8) correspondendo a uma Fragmentação Relativa de 292,0% e grande capacidade de hidrólise da actina e miosina, observada através Padrão de Digestão Miofibrilar por SDS-PAGE, além da degradação do tecido observada na análise histológica. Os resultados obtidos demonstram o grande potencial da collagenase obtida de *Aspergillus tamarii* URM 4634 em ser usada como amaciante cárneo.

Palavras-chaves: proteases, atividade collagenolítica, purificação, tenderização de carnes.

CHAPTER II
PRODUCTION OF PROTEASES WITH COLLAGENOLITIC ACTIVITY BY
FERMENTATION IN SOLID STATE FOR APPLICATION IN MEAT
TENDERIZATION

ALMEIDA, E. M.¹; SILVA, O. S.¹; PORTO, T. S.¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns.
Av. Bom Pastor s/n, 55296-901, Garanhuns – PE.

ABSTRACT

Proteases are enzymes responsible for the cleavage of peptide bonds of protein molecules and can be obtained biotechnologically through fermentation. Collagenases are specific proteases in hydrolyzing collagen peptide bonds and can be used in the chemical, pharmaceutical and food technology areas. The objective of the present work was to produce and purify proteases with collagenolytic activity by Solid State Fermentation for application in meat softening. After 72 h of SSF with 5 g of wheat fiber, 40% humidity at 30°C, the collagenase obtained showed an collagenolytic activity of 296.6 U/mL. The enzyme purified by DEAE-Sephadex A50 ion exchange chromatography presented a purification factor of 6.28 times, a specific activity of 459.03 U/mg and a recovery of 45.4%. Protease activity showed an increasing behavior between 0.2 and 0.4 M NaCl concentrations, with a maximum residual activity of 85.8% and a protein activity of 37.16 U/mL. The results of the factorial design showed that both pH and temperature were significant and had negative effects on protease activity with great results at pH 8,0 e temperatura 40°C, whereas they were not significant for collagenolytic activity with higher values at pH 9,0 e temperatura 50°C . The application of protease to the meat tenderization process demonstrated the strong efficiency of the enzyme in degrading the myofibrillar proteins of meat expressed in high water loss (15.75%), high Myofibrillar Fragmentation Index (250.8) corresponding to a Fragmentation Relative of 292.0% and high capacity of hydrolysis of actin and myosin, observed through Myofibrillar Digestion Standard by SDS-PAGE, besides the tissue degradation observed in the histological analysis. The results obtained demonstrate the great potential of the collagenase obtained from *Aspergillus tamarii* URM 4634 to be used as a meat tenderizer.

Key-words: proteases, collagenolytic activity, purification, meats tenderization.

1. INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas que catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas constituintes das moléculas de proteínas e apresentam um campo em expansão para biotecnologia, pois contribuem em cerca de 60% do total de vendas no mercado mundial de enzimas. Em virtude de recentes melhorias às técnicas de produção e purificação, as proteases podem assumir um amplo e variado espectro de aplicação industrial como no processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, indústria têxtil, entre outros (ORLANDELLI et al., 2012; LADEIRA et al., 2010).

As proteases podem ser obtidas de diversas fontes, incluindo plantas, animais e micro-organismos. A produção por via microbiana tem sido a alternativa mais utilizada para obtenção dessas enzimas, uma vez que representa a opção mais viável capaz de atender com maior eficiência a demanda do mercado mundial, já que as outras fontes apresentam fatores que dificultam a produção contínua, devido às condições climáticas bem como características físico-químicas do solo e animais suficientes para o abate (SOUZA, 2015).

Na técnica de obtenção de enzimas por meio de micro-organismos, o processo utilizado é a fermentação que pode ser submersa ou em estado sólido (SILVA et al., 2014). A Fermentação em Estado Sólido (FES) representa uma alternativa para o uso de resíduos agroindustriais, uma vez que estes são utilizados como substratos que atuam fornecendo carbono, nitrogênio, energia e demais componentes, servindo ainda como suporte para o crescimento das células microbianas (PINTO et al., 2005). Além disso, quando comparada à Fermentação Submersa (FSm), a FES é a que mais se aproxima da condição de crescimento natural dos fungos já que atua na ausência, total ou quase, de água livre fazendo com que ocorra um maior crescimento desses micro-organismos, secretando também níveis mais altos de metabolitos e enzimas (SILVA et al., 2016).

Na FES, os fungos filamentosos se destacam em detrimento de outros micro-organismos como bactérias e leveduras devido à capacidade de crescerem em meio com pouca água e alta concentração de sólidos, além da formação de hifas que favorece a colonização do meio (NASCIMENTO, 2014). Nesse contexto, os fungos do gênero *Aspergillus* têm sido bastante utilizados para produção de enzimas, pois além de se adaptarem às condições da FES, algumas cepas do micro-organismo são consideradas seguros pela Food and Drug Administration (FDA) podendo então ser utilizado para aplicações na indústria de alimentos (SILVA et al., 2016).

Dentre as proteases que podem ser obtidas através da fermentação utilizando fungos filamentosos, estão as collagenases. Estas enzimas são responsáveis pela clivagem das ligações dos peptídeos do colágeno. O colágeno, por sua vez, consiste de uma proteína fibrosa e insolúvel que pode ser encontrado na pele, nos ossos e nos tendões de organismos multicelulares (DUARTE, 2012).

As collagenases microbianas podem ser utilizadas em diversas aplicações nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos. Na área alimentícia, essas proteases têm recebido grande destaque no processo de tenderização de carnes, resultando em derivados cárneos com sabor e textura mais agradáveis (BENITO et al., 2002). Assim, em virtude da sua grande potencialidade em aplicações nas mais diversas áreas se torna imprescindível a adoção de técnicas capazes de purificar essas enzimas (SUHOSYROVA, 2003).

Através do processo de purificação enzimática é possível eliminar constituintes indesejáveis do meio de cultivo como, por exemplo, elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas e outros metabólitos extracelulares que não a proteína de interesse (DINI, 2010). A cromatografia é um método de purificação baseado na separação diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária (BERG, TYMOCZKO e STRYER, 2007).

A cromatografia de troca iônica pode ser aplicada para purificação de collagenases microbianas. Nesse método de purificação, a fase estacionária é altamente carregada e os solutos da fase móvel possuem cargas de sinais contrários a esta, possibilitando a adsorção desses compostos. Os solutos adsorvidos podem ser posteriormente eluídos, através do deslocamento da fase móvel com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com uma força de interação maior com a fase estacionária. Fatores como pH e força iônica podem ser controlados para promover as diferenças de carga entre as duas fases, influenciando diretamente na afinidade entre elas (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006).

O presente estudo teve como objetivo a produção de proteases com atividade collagenolítica por fermentação em estado sólido (FES) com fungo filamentoso *Aspergillus tamarii*, bem como sua purificação por cromatografia de troca iônica para posterior avaliação de seu potencial na tenderização de carnes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Micro-organismos

O micro-organismo *Aspergillus tamarii* URM4634 foi gentilmente cedido pela coleção de culturas da Micoteca URM, do departamento de Micologia, do centro de biociências, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e mantidos a 28°C em tubos de ensaios inclinados contendo meio Czapek Dox Agar. O repique para manutenção foi feito a cada 28 dias.

2.2 Preparação do inóculo

A inoculação do micro-organismo foi realizada em Erlenmeyers de 125mL que continham meio de cultura BDA (Batata Dextrose Ágar) já esterilizados onde foram incubados a 30°C em estufa por 7 dias, até que ocorresse a esporulação. Os esporos foram suspensos com a adição de solução de NaCl (0,9%) e Tween 80 (0,01% v/v) previamente esterilizados. Em seguida, foi realizada a contagem de esporos em câmara de Neubauer, onde o inóculo foi padronizado para concentração de 10^7 esporos/mL.

2.3 Substrato para fermentação

O substrato utilizado para Fermentação em Estado Sólido foi o farelo de trigo obtido do comércio local de Garanhuns-PE. A granulometria do substrato foi padronizada entre 0,5 - 2,0 mm em membranas de Tyler e em seguida secos em estufa a 65°C. O armazenamento foi realizado em recipientes hermeticamente fechados à temperatura ambiente.

2.4 Produção de protease collagenolítica por fermentação em estado sólido

A fermentação ocorreu em Erlenmeyers de 250 mL contendo 5g do substrato farelo de trigo esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm durante 20 minutos. Ao substrato foram adicionados o inóculo com concentração de 10^7 esporos/mL e a solução nutritiva (extrato de levedura 0,5% e glicose 1% em tampão fosfato 0,1M pH 7,0) para obtenção de uma umidade final de 40%. Os substratos inoculados foram então incubados em estufa a 30°C por 72 horas para produção de proteases por fermentação em estado sólido. As condições para fermentação foram definidas segundo trabalho de Silva (2014).

2.5 Extração da enzima

Ao término da fermentação, foi adicionado tampão Fosfato de Sódio 0,1 M pH 7,0 numa proporção de 7,5 mL/g de fermentado. Foi realizada a homogeneização em mesa agitadora por 2 horas, seguida da maceração e filtração em tecido gaze. O filtrado foi centrifugado por 10 min a 5000 rpm a 4°C (SILVA et al, 2016). O sobrenadante (extrato bruto) obtido foi coletado e armazenado para os experimentos posteriores.

2.6 Determinação de atividade proteásica

Para determinação da atividade proteásica foi utilizado o método descrito por Ginther (1979) em que o substrato utilizado é a Azocaseína (1%) com CaCl_2 10^{-3} M. O substrato foi solubilizado em tampão Tris-HCl, 0,2 M, pH 7,2, a temperatura ambiente. A reação consistiu na adição de 150 μL do extrato enzimático e 250 μL do substrato Azocaseína 1%. A mistura foi incubada por 1 hora sob abrigo da luz 25°C. Em seguida, a reação foi interrompida com 1000 μL de TCA 10%. Foi realizada a centrifugação das amostras a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e 0,8mL do sobrenadante foi adicionado a 200 μL de NaOH 1,8N. Uma unidade de atividade da protease representa a quantidade de enzima necessária para produzir uma variação de absorbância de 0,1 em 1 hora utilizando um comprimento de onda de 420nm. O resultado obtido é expresso em U/mL.

2.7 Determinação da atividade collagenolítica

A atividade collagenolítica foi determinada utilizando o método proposto por Chavira et al. (1984) com algumas modificações. O substrato utilizado foi o Azocoll na concentração de 5 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8. Foram realizadas sucessivas lavagens do substrato com o tampão até verificar que o Azocoll não estava mais liberando nenhuma cor através da análise espectrofotométrica. A reação consistiu na adição de 50 μL do extrato enzimático e 950 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,8 ao substrato após as lavagens. A mistura foi incubada em banho-maria por 3 horas a 37°C, onde a cada 15 minutos as amostras eram agitadas. Assim como na atividade proteásica, para efeito de cálculos foi considerado que uma unidade da protease é a quantidade necessária de enzima para produzir uma mudança na absorbância de 0,1 em 1 hora realizando a leitura em um comprimento de onda de 520 nm. O resultado obtido é expresso em U/mL.

2.8 Determinação do teor de proteína

As proteínas totais foram determinadas utilizando o método descrito por Bradford (1976) em que utiliza como corante Comassie Brilliant Blue G-250 e como padrão Albumina de Soro Bovino (BSA). A reação consistiu na adição de 50 µL da amostra e 1500 µL do reativo de Bradford com curva previamente calibrada. A leitura das amostras após a reação foi realizada a 595nm. Os resultados foram expressos em mg/mL.

2.9 Precipitação cetônica

A precipitação da proteína consistiu no preparo de uma solução contendo 30% de extrato bruto e 70% do solvente orgânico (acetona). A solução foi misturada sob agitação manual, lenta e constante e em seguida foi mantida por refrigeração por 20 minutos. Após esse tempo a amostra foi centrifugada (5.000 rpm por 20 min a 4°C) e todo o sobrenadante foi descartado. O precipitado resultante foi levado ao exaustor para facilitar a evaporação da acetona remanescente e em seguida foi ressuspenso em 1mL de tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0.

2.10 Purificação por cromatografia de troca iônica

Para a cromatografia foi utilizada uma coluna manualmente empacotada com a resina DEAE-Sephadex A-50 (2,3 x 10 m), equilibrada com Tris HCl 20mM pH 8,0. O fluxo da coluna foi ajustado para 1 mL/min e em seguida foi realizada a injeção de 1mL do precipitado cetônico. A fase móvel da coluna consistiu no tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0 e a eluição foi realizada com o mesmo tampão adicionado de NaCl 0,5 M. As frações coletadas foram submetidas à leitura espectrofotométrica a 280nm e análise do Fator de Purificação e Rendimento que podem ser determinados a partir das Equações 1 e 2, respectivamente:

$$FP = \frac{AE_{\text{fração coletada}}}{AE_{\text{Extrato Bruto}}} = \frac{\frac{AP_{\text{da fração coletada}}}{TP_{\text{da fração coletada}}}}{\frac{AP_{\text{do Extrato Bruto}}}{TP_{\text{do Extrato Bruto}}}} \quad (1)$$

Em que FP representa o Fator de Purificação, AE a Atividade Específica, AP a Atividade Proteásica e TP o Teor de Proteína.

$$Y = \frac{X_i \cdot V_p}{X \cdot V_{eb}} \cdot 100 \quad (2)$$

Onde os parâmetros V_p e V_{eb} representam o volume do purificado e do extrato bruto, respectivamente. O X pode representar a atividade enzimática em (U/mL) ou a concentração de proteínas em (mg/mL) para a recuperação em atividade e em proteína, respectivamente.

2.11 Estabilidade em Cloreto de Sódio (NaCl)

Para realização do teste de estabilidade ao Cloreto de Sódio, a protease purificada foi incubada em diferentes soluções de NaCl na proporção de 1:1 por 30 minutos onde as concentrações de NaCl variaram linearmente de 0 a 1M. Ao término do tempo de exposição foi determinada a atividade proteásica de cada uma das amostras, de acordo com o item 2.6. Foi considerada como controle (100%) a atividade enzimática correspondente a um ensaio sem cloreto de sódio.

2.12 Planejamento fatorial completo 2^2 da caracterização para avaliação dos efeitos de pH e temperatura nas atividades proteásica e colagenolítica

Para verificar a influência do pH e Temperatura nas atividades proteásica e colagenolítica da protease purificada, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2 com quatro repetições do ponto central. A codificação dos níveis altos e baixos deste estudo foi representada por +1 e -1, respectivamente, e o ponto médio foi codificado como 0, conforme descrito na Tabela 2.1. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0.

Tabela 2.1: Níveis dos fatores do Planejamento fatorial completo 2^2 para avaliação da influência do pH e Temperatura nas atividades proteásica e colagenolítica da protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.

Variável	Níveis		
	Inferior (-1)	Central (0)	Superior (+1)
pH	8	9	10
Temperatura (°C)	40	50	60

2.13 Aplicação da protease purificada na tenderização de carnes

A aplicação da protease foi realizada utilizando um corte da região dianteira do boi (cupim) e todas as proteínas utilizadas (bruta, purificada e papaína comercial Sigma-Aldric®) foram padronizadas para 0,1 mg/mL e atividade colagenolítica para 60 U/mL, aproximadamente. O tamanho da carne (peso, diâmetro), bem como a quantidade de enzima

aplicada e tempo de aplicação estão relacionados às demandas específicas de cada análise realizada, conforme descritos nos subitens subsequentes.

2.14 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A medição da Capacidade de Retenção de Água foi realizada pesando com precisão amostras de 3,5-4,5g de carne previamente limpas com papel de filtro para remover a água superficial. Este peso refere-se ao peso da carne crua (P_0). Posteriormente, as amostras foram tratadas com protease bruta, protease purificada (ambas obtidas de *Aspergillus tamarii* URM 4634) e papaína a 4°C durante 72h. Após o tratamento, a água superficial foi removida por absorção e as amostras foram pesadas, em que este peso representa o peso da carne após o tratamento enzimático (P_1). A perda de água da carne foi calculada utilizando a Equação 3.

$$CRA = 100 \times \left(\frac{P_0 - P_1}{P_0} \right) \quad (3)$$

2.15 Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM)

O Índice de Fragmentação Miofibrilar foi determinado de acordo com o método sugerido por Chen et al. (2006) com algumas modificações. As análises foram realizadas em duplicata com 4g de carne bovina cortada em pedaços medindo 0,5 x 0,5cm e tratadas cada ensaio com 1 mL de proteína purificada, bruta e comercial (papaína). No controle foi utilizado 1 mL de água. Esses ensaios foram mantidos refrigerados por 20 h, e posteriormente colocados em temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, foi adicionado 50 mL de tampão refrigerado a 4°C (Tris-HCl 50 mM a pH 7,6 com KCl 100 mM e EDTA 5 mM) mantendo em reação por 1 min. As proteínas miofibrilares foram sedimentadas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C durante 10 min e ressuspensas em 50 mL do mesmo tampão por 1 minuto. Esse processo de ressuspensão/sedimentação foi repetido por mais três vezes, e na última ressuspensão foi utilizado metade do volume de tampão inicial. As proteínas miofibrilares ressuspensas foram filtradas utilizando uma rede de Nylon de 20 Mesh para remoção do tecido conjuntivo. As proteínas esticadas, foram sedimentadas por centrifugação a 5000 rpm a 4°C durante 10 min e lavadas com 50 mL de KCl 1M três vezes e finalmente suspensas em KCl 100 mM. A turvação da solução final foi medida a 540 nm e o IFM foi estimada pela Equação 4 abaixo:

$$IFM = A_{540} \times 200 \quad (4)$$

A constante (fator), 200, expande as unidades de absorbância numa faixa de 30 a 100 vezes e esses valores serão o índice de fragmentação miofibrilar.

2.16 Padrão de Digestão Miofibrilar

Para avaliar a eficiência da ação das proteases (bruta, purificada e comercial) sobre a proteína miofibrilar obtida na etapa anterior com o tratamento controle, foi realizado um Padrão de Digestão Miofibrilar utilizando eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), realizada conforme descrito por Laemmli (1970). A proteína miofibrilar foi diluída em água destilada para padronização do teor proteico a 0,5 mg/mL e submetidas a liofilização. Uma mistura de 1 mL (100 μ L da respectiva protease + 900 μ L de água) foi adicionada aos ensaios contendo a proteína miofibrilar liofilizada e incubada durante 37°C durante 1h. Essa mistura foi centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 10 min e o sobrenadante obtido foi liofilizado e submetido a eletroforese SDS-PAGE a 12%.

Para determinar o efeito da digestão da protease purificada sobre a proteína miofibrilar em temperaturas de armazenamento (refrigeração / 4°C) e aquecimento (37°C), as proteínas miofibrilares serão tratadas nas respectivas temperaturas durante 0-60 min e submetidas a eletroforese SDS-PAGE a 12%.

2.17 Análise histológica

Para avaliação do efeito das proteases sobre os tecidos cárneos, amostras tratadas foram submetidas à análise histológica. O tratamento das amostras consistiu da adição de 1mL de cada protease avaliada (controle, extrato bruto, purificada e papaína) sobre a carne previamente cortada com dimensões de 2 x 1 x 0,5 cm. Os tecidos, retirados da superfície da amostra tratada, foram fixados durante 24 horas em formaldeído a 10% tamponado com fosfato (pH 6,9-7,1). Posteriormente, os tratamentos foram submetidos à etapa de inclusão, em que as amostras tratadas e fixas são colocadas em cassetes de processamento Tissue-Tek e embebidas em cera de parafina, onde permaneceram em *overnight*. As seções foram cortadas a 5 μ m de espessura num micrótomo rotativo (Leica Byosystems RM2125RTS, Alemanha), desidratadas em *overnight* a 56 ° C e coradas com hematoxilina e eosina. As secções coradas foram avaliadas por um microscópio de luz (Labophot-2, Nikon, Japão). As imagens foram gravadas usando uma câmera de vídeo digital (micropublisher QImaging 3.3 RTV, Surrey, BC, Canadá).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de protease collagenolítica por fermentação em estado sólido

A collagenase produzida por *Aspergillus tamaraii* URM 4634, após as 72 h de fermentação em estado sólido apresentou uma atividade collagenolítica de 296,6 U/mL e

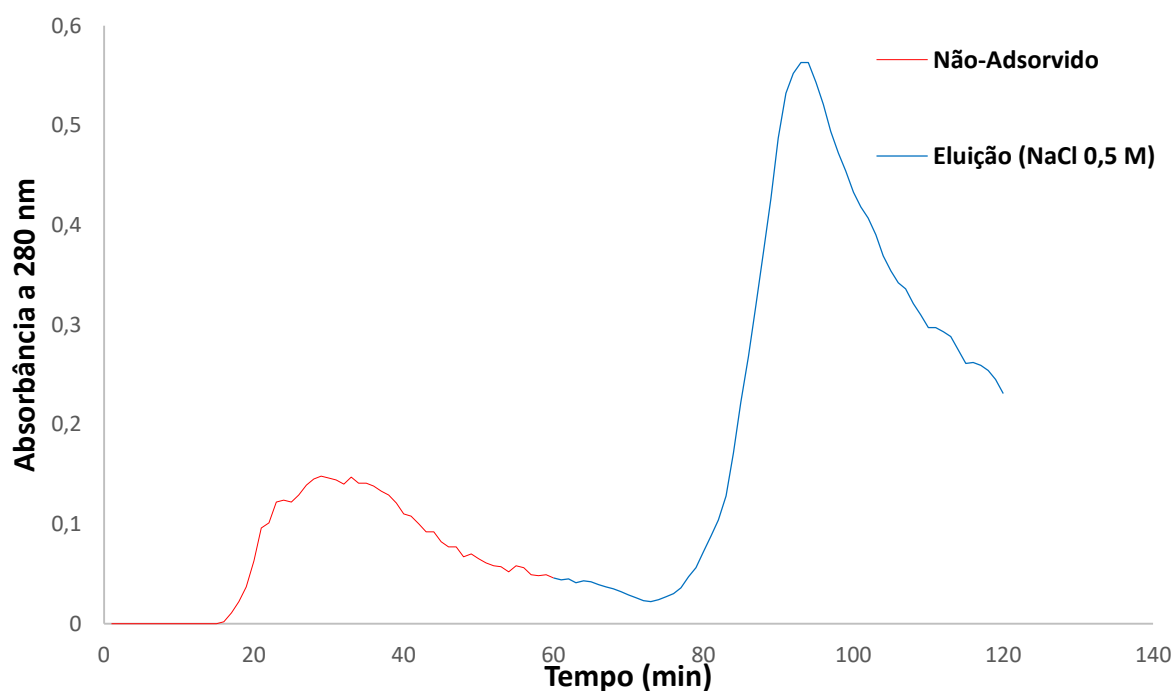
atividade proteásica de 76,2 U/mL. As altas atividades enzimáticas encontradas demonstram a capacidade do micro-organismo e do tipo de fermentação utilizados para produção de proteases com elevada atividade colagenolítica. Em seus estudos Lima et al. (2014) encontraram uma atividade colagenolítica máxima de 79,38 U/mL quando avaliavam a produção de collagenase por *Bacillus stearoothermophilus* de solo amazônico. Já Silva et al. (2016b) utilizando o micro-organismo *Aspergillus* sp. UCP 1276 em fermentação submersa obtiveram 63,38 U/mL de atividade colagenolítica após 72h de fermentação.

3.2 Purificação por cromatografia de troca iônica

A amostra resultante da precipitação cetônica foi submetida à cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50. O perfil de eluição obtido está apresentado na Figura 2.1, em que foi utilizado tampão de equilíbrio Tris-HCl 20mM (pH 8,0) e NaCl na concentração de 0,5 M.

No cromatograma (Figura 2.1) pode ser observado que a primeira fase da purificação é caracterizada pela fração não-adsorvida, ou seja, essa fase é composta de outras moléculas com a mesma carga ou sem carga que por sua vez não foram capazes de interagir com a resina e consequentemente foram eluídas primeiro.

Figura 2.1: Cromatograma de eluição da protease produzida por *Aspergillus tamaritii* URM 4634 na cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50.



A eluição da protease foi observada a partir da fração de 91 min, representada no cromatograma por um pico e ocorreu em detrimento da eluição da solução tampão com o gradiente de sal, o qual desfaz a ligação entre a enzima e a fase estacionária (matriz) da coluna cromatográfica. O aumento da concentração de sal no tampão faz com que as interações eletrostáticas entre a resina e a proteína sejam enfraquecidas, promovendo assim o arraste da proteína pela fase móvel da coluna (SCHULZE, MASCHKE e MONKS, 2018).

O pico obtido foi submetido a análise da atividade proteásica e teor de proteína para avaliação da eficiência do processo de purificação por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50, a qual apresentou uma purificação de 6,28 vezes, uma atividade específica de 459,03 U/mg e uma recuperação de 45,4%, conforme mostrado na Tabela 2.2:

Tabela 2.2: Resultado da precipitação e da Cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex A-50 para a protease com eluição em 0,5 M de NaCl.

Amostra	Volume (mL)	AP (U/mL)	TP (mg/mL)	AE (U/mg)	FP	Y (%)
Extrato Bruto	15	76,2	0,764	99,673	1	100
Precipitado	1	109,6	1,5	73,044	0,733	13,08
Cetônico						
DEAE-Sephadex	6	52,1	0,113	459,031	6,285	45,4

*AP – ativ. Proteásica; TP – teor de proteína; AE – ativ. Específica; FP – Fator de Purificação; Y – Recuperação.

Racheal et al. (2015) reportaram uma purificação 9,96 vezes para protease purificada obtida de *Aspergillus niger* isolado de cascas de inhame, utilizando cromatografia de troca iônica DEAE-celulose com uma recuperação de 11,04% e atividade específica de 5,11 U/mg. Quando comparamos estes dados com os obtidos neste trabalho para a protease de *Aspergillus tamarii*, pode-se observar que apesar da purificação ter sido menor, a recuperação foi aproximadamente 4 vezes maior. Liu et al. (2010) ao purificarem proteases com atividade colagenolítica de *Bacillus cereus* por cromatografia de troca iônica encontraram um fator de purificação de 12 vezes com uma recuperação de 38,9% e atividade específica de 1439 U/mg.

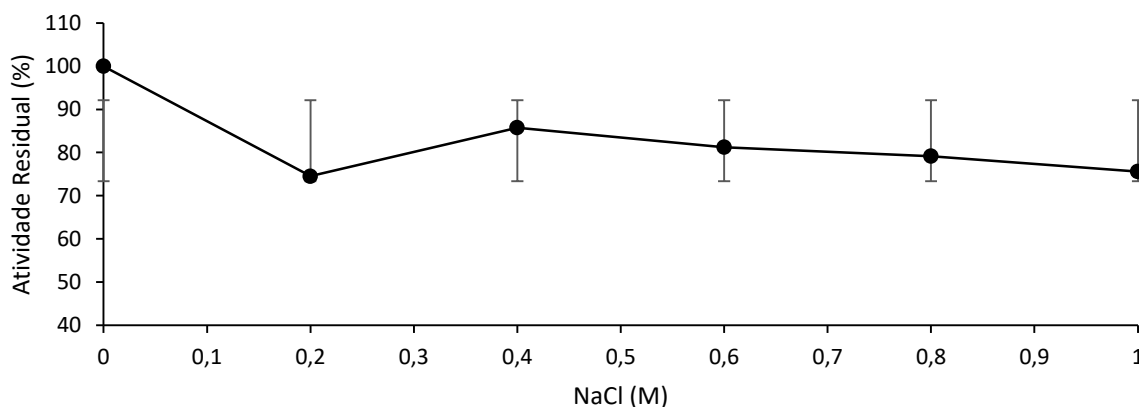
Esses resultados demonstram que existem muitas variações nos parâmetros que avaliam a eficiência de uma purificação, decorrentes das especificidades de cada purificação, como resina utilizada, micro-organismo, método de precipitação, etc. Enquanto o fator de purificação obtido nesse trabalho (6,285 vezes) foi relativamente inferior aos encontrados na

literatura, a atividade específica (459,031 U/mg) e o rendimento (45,4%) foram superiores aos encontrados pelos dois autores citados.

3.3 Estabilidade da protease purificada em NaCl

A Figura 2.2 apresenta o perfil de comportamento da protease purificada quando submetida a diferentes concentrações de NaCl. Esses resultados demonstraram uma atividade crescente da enzima nas concentrações de NaCl entre 0,2 e 0,4 M, com uma atividade residual máxima de 85,8% em 0,4 M correspondente a atividade proteásica de 37,16 U/mL. A partir da concentração de 0,5 M a atividade da enzima é reduzida até 75,6% de atividade residual e 32,76 U/mL atividade proteásica. Esses estudos são necessários, devido aos amaciantes industriais de carne normalmente, apresentarem em sua composição cloreto de sódio. Através desse estudo da estabilidade da collagenase obtida é possível conhecer a concentração máxima de NaCl que pode estar presente nessas composições sem prejudicar a atividade da enzima.

Figura 2.2 Estabilidade ao NaCl da protease de *Aspergillus tamaraii* URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.



De acordo com Bobbio (2001) grande parte das reações biológicas acontecem em meio aquoso, dessa forma ao adicionar pequenas quantidades de sais neutros (como o NaCl) às soluções proteicas/enzimáticas acaba favorecendo o aumento da solubilidade dessas moléculas, ocorrendo assim uma maior solvatação da proteína, acelerando, portanto, as reações biológicas. Esse fenômeno de aumento de solubilidade é denominado dissolução por sais (“*salting in*”) e é causado pelas forças de atração entre os íons de proteínas e os íons de sal (ZHANG, 2012).

Por outro lado, ao adicionar níveis elevados de sal, como observado no presente trabalho a partir de uma concentração de NaCl 0,5 M, ocorre uma predominância das

interações água-sal, em detrimento das interações água-proteína (efeito "salting out"), contribuindo para reduzir a solubilidade proteica, interferindo assim na diminuição da atividade da enzima (BABU et al., 2008).

A protease obtida nesse trabalho apresentou-se mais tolerante ao sal (atividade máxima em 0,4M) quando comparada à protease obtida por Papagianni e Sergedelis (2014), em que a alcalino-protease de *Penicillium nalgiovense* apresentou uma atividade máxima numa concentração de 0,25 M de NaCl. Também foi mais estável que a protease reportada por Aissaoui (2014) obtida de *Penicillium digitatum*, que apresentou uma atividade máxima em uma concentração de NaCl 1% (0,16M).

3.4 Planejamento Fatorial completo 2² para caracterização bioquímica da atividade enzimática

A matriz do planejamento fatorial, com os respectivos resultados para a caracterização bioquímica com as atividades proteásica (AP) e collagenolítica (AC) estão apresentadas na Tabela 2.3. Este tipo de abordagem não é comum em caracterizações bioquímicas de enzimas. Normalmente a caracterização é avaliada variando um parâmetro por vez e isoladamente, porém este tipo de abordagem não avalia a interação que pode existir entre as variáveis estudadas. Deste modo, após a verificação da faixa ótima indicada do modo tradicional, realizou-se o planejamento fatorial para avaliar a interação entre pH e temperatura, bem como pH e temperatura ótimos.

Tabela 2.3: Resultados do Planejamento Fatorial completo 2² para caracterização bioquímica da protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	AP (U/mL)	AC(U/mL)
1	8	40	116,73	8,6
2	10	40	61,90	7,4
3	8	60	61,83	9,8
4	10	60	11,36	23,7
5 (C)	9	50	43,66	26,4
6 (C)	9	50	41,46	28,7
7 (C)	9	50	40,93	36,6
8 (C)	9	50	38,33	36,3

AP-Atividade proteásica; AC-Atividade collagenolítica

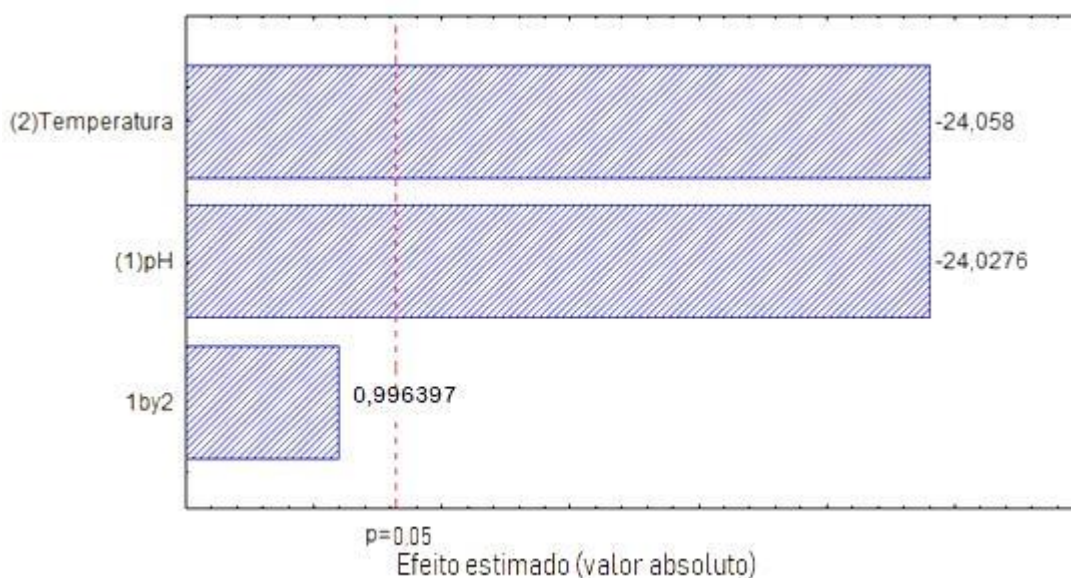
O gráfico de Pareto (Figura 2.3), com 95 % de confiança, apresenta os resultados das variáveis analisadas (pH e T) frente a uma das variáveis resposta, a atividade proteásica. A análise estatística mostrou que as variáveis pH e temperatura apresentaram efeitos

significativos sobre a atividade da protease, no entanto, não foi observado interação significativa entre elas. Os efeitos apresentados tanto pela temperatura, quanto pelo pH se mostraram negativos, assim a diminuição desses parâmetros indica uma maior atividade da enzima. O que é possível observar que no ensaio 1 com a condição de menor temperatura (40°C) e pH (8,0) a atividade proteásica foi máxima (116,73 U/mL).

Os resultados obtidos corroboram com o estudo realizado por Silva et al. (2016b) ao avaliarem pH e temperatura ótima de uma protease obtida de *Aspergillus tamarii* URM 4634 em Fermentação em Estado Sólido, em que obtiveram pH 8,0 e temperatura 40°C como parâmetros ótimos da atividade proteásica. A protease obtida por esses autores apresentou 417,67 U/mL como valor máximo para atividade proteásica em pH 8,0 e atividade relativa de 100% em 40°C. Resultados semelhantes também foram reportados por Coral et al (2003) que ao estudarem a estabilidade de uma protease produzida por *Aspergillus niger* obtiveram uma temperatura ótima em 40°C, tendo pH 9,0 como ótimo.

De acordo com Ferro (2012), o efeito do pH na velocidade das reações enzimáticas pode ser devido às alterações da estabilidade da enzima, da afinidade da enzima para o substrato e da transformação catalítica em si, podendo esses fatores atuarem de forma conjunta ou individual. No entanto, esse parâmetro deve ser controlado pois como mostrado nesse estudo quando a faixa alcalina é aumentada a atividade da protease tende a ser diminuída. A temperatura é um dos fatores mais importantes a serem controlados em um bioprocessos e apresenta relação direta sobre a atividade da enzima. Temperaturas elevadas podem causar a desnaturação da enzima através do rompimento das ligações de hidrogênio, reduzindo assim a sua atividade (BORZANI et al., 2001).

Figura 2.3 Gráfico de Pareto de efeitos de variáveis na atividade proteásica da protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.

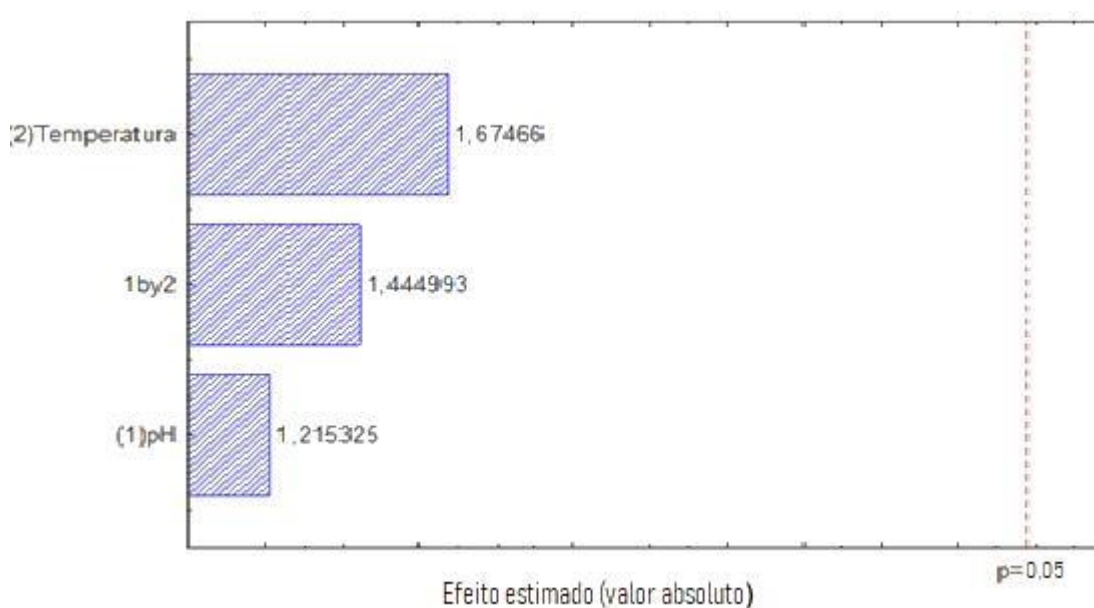


Os efeitos das variáveis analisadas (pH e T) sobre a variável resposta atividade collagenolítica, podem ser observados no gráfico de Pareto apresentado na Figura 2.4. Através desta figura foi observado que nenhuma das variáveis analisadas apresentaram efeitos significativos sobre a atividade collagenolítica, portanto a melhor condição da collagenase se dá nos pontos centrais com pH 9,0 e temperatura 50°C, onde foram observados os maiores valores de atividade (entre 26,4 e 36,6 U/mL). Os resultados observados na Tabela 2.3 não demonstraram valores significativamente distintos uma vez que se apresentaram próximos entre si e no ensaio com níveis mais alto (+1 (pH 10) e +1 (60°C)) apresentou atividade dentro dos valores do nível 0 (Tabela 2.3).

O pH 9,0 é citado como ótimo nos trabalhos de Sakurai et al. (2009) para collagenase de *Streptomyces parvulus*, Duarte et al. (2012) que obteve collagenase de *Penicillium aurantiogriseum* e Lima et al. (2014) para collagenase de *Bacillus stearothermophilus*.

A temperatura ótima de 50°C também foi observada por Lima et al. (2014). Entretanto, maiores temperaturas também foram obtidas por Suphatharaprateep et al. (2011), que utilizaram *Bacillus cereus* para produção de collagenases. Esse resultado demonstra que cada micro-organismo tem suas características físico-químicas e exigências nutricionais para o crescimento e produção enzimática (READDY et al. 2008).

Figura 2.4: Gráfico de Pareto de efeitos de variáveis na atividade collagenolítica da protease de *Aspergillus tamarii* URM4634 purificada por cromatografia de troca iônica DEAE-Sephadex.

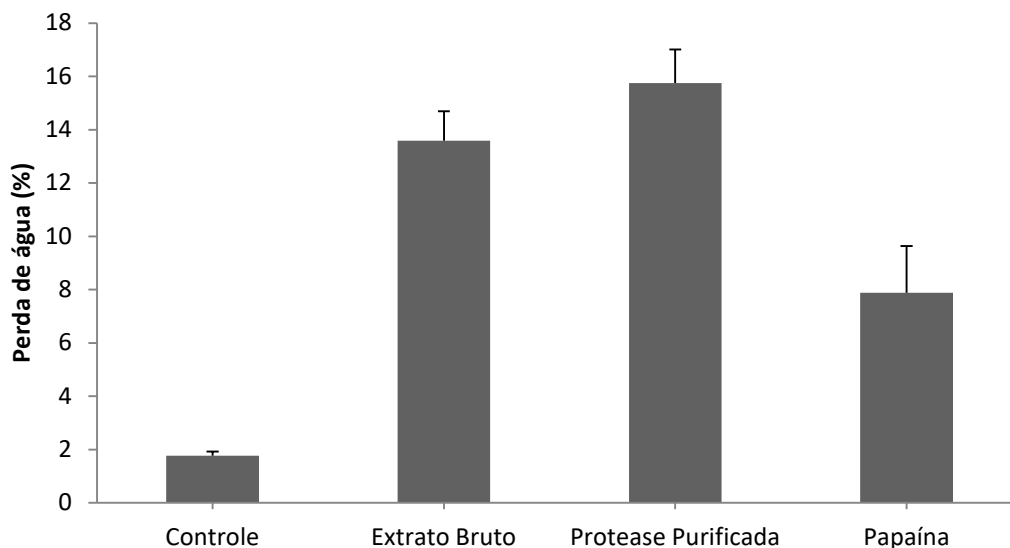


3.5 Aplicação da protease purificada na tenderização de carnes

3.5.1 Capacidade de Retenção de Água (CRA)

A Figura 2.5 ilustra a Capacidade de Retenção de Água (CRA), expressa em perda de água da carne após 72 h de tratamento a 4°C com diferentes proteases:

Figura 2.5: Perda de água da carne bovina após 72h de tratamento a 4°C com diferentes enzimas.



A CRA é definida como a habilidade da carne em reter água mediante a aplicação de forças externas, mecânicas ou térmicas, portanto pode ser expressa como a quantidade de água perdida em relação à quantidade de água retida no músculo ou proteínas do músculo. Conforme pode ser observado (Figura 2.5), o tratamento com a protease purificada apresentou o maior teor de perda de água (15,75%), seguido da amostra com extrato bruto (13,59%), papaína (7,88%) e controle (1,77%).

De acordo com Barbetta e Grigio (2014), a água presente na carne associa-se com as proteínas musculares, indicando o estado em que ela se encontra na musculatura podendo ser classificada em água livre, parcialmente ligada e ligada às proteínas. As miofibrilas exercem um papel fundamental na ligação entre água e proteína, sendo as principais responsáveis pela CRA (SANTOS, 2007).

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem que a amostra tratada com protease purificada de *Aspergillus tamarii* URM4634 apresentou uma maior degradação das proteínas miofibrilares que enfraqueceram sua ligação com a água ocasionando, portanto, numa maior liberação desta durante o tratamento térmico.

O processo de purificação das proteases aumenta a especificidade dessas enzimas sobre os substratos de interesse, o que justifica a maior interação com as proteínas e consequente perda de água desse tratamento quando comparado aos outros ensaios estudados (extrato bruto e papaína). Já no tratamento controle, a perda de água observada se deve a exsudação de água livre que se encontra retida por forças capilares fracas (SANTOS, 2007)

O conteúdo de água pode ser utilizado como um fator indicativo de propensão à deterioração ou contaminação microbiológica de um alimento, portanto sua redução ocasionada pelo tratamento com a protease implica no aumento da estabilidade microbiológica da matriz cárnea estudada. É importante destacar que altos valores de perda de água podem estar associados à obtenção de carnes com aspecto duro e seco, no entanto, mesmo no ensaio (protease purificada) que apresentou a maior perda de água (15,75 %), a retenção correspondente de 84,25% não se mostra suficiente para resultar numa carne com essas características indesejáveis.

Zhao et al. (2012) ao estudarem o efeito da tenderização em carne bovina utilizando uma protease collagenolítica observaram que a perda de água no tratamento com a protease purificada (2%) foi menor quando comparada aos ensaios com bromelina (5,5%) e papaína (8%) indicando que a collagenase estudada por esse autor apresentou uma menor degradação das proteínas miofibrilares.

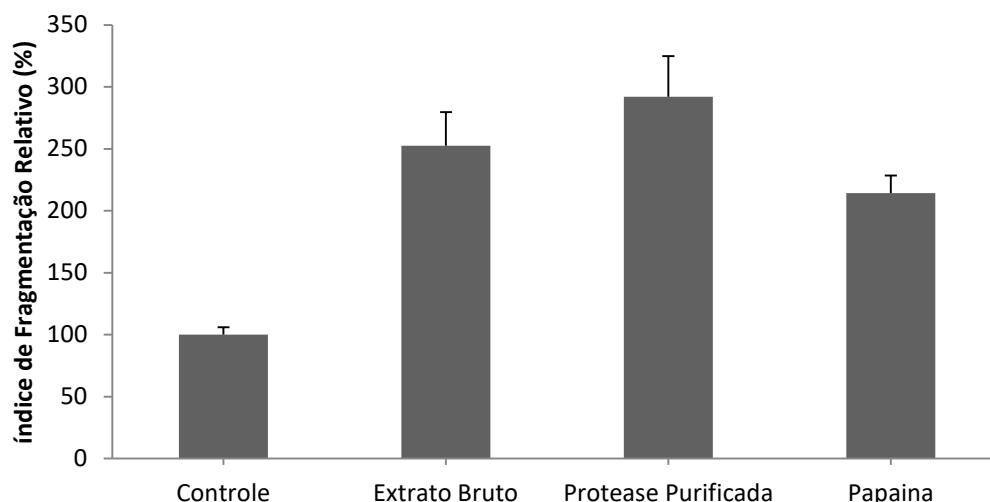
3.5.2 Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM)

Os resultados obtidos para o Índice de Fragmentação Miofibrilar (IFM) podem ser observados na Tabela 2.4 que correspondem aos índices de fragmentação relativo expressos na Figura 2.6.

Tabela 2. 4: Resultados do índice de Fragmentação Miofibrilar em diferentes tratamentos da amostra cárnea com proteases

Tratamento	IFM ($A_{540} \times 200$)	Desvio Padrão
Controle	85,9	6,1
Extrato Bruto	216,9	27,0
Protease Purificada	250,8	32,8
Papaína	184	14,1

Figura 2.6 Índice de Fragmentação Miofibrilar Relativo nos diferentes tratamentos da amostra cárnea com proteases.



O Índice de Fragmentação Miofibrilar é reportado por vários autores (Chen et al., 2006; Lametsch et al., 2007; Zhao et al., 2012; Marino et al., 2015) como sendo um dos principais indicativos de maciez da carne. Essa medida baseia-se no fato de que com a degradação da linha Z, por meio da proteólise, as miofibrilas presentes tornam-se mais fracas, ficando mais susceptíveis a serem quebradas em pequenos fragmentos durante o processo de homogeneização. Essa maior facilidade de quebra relaciona-se com uma maior maciez da matriz cárnea (ISHIHARA; MADRUGA, 2013). Segundo Culler et al. (1978), a carne pode ter sua maciez classificada em função dos valores de IFM, no qual foram consideradas macias as carnes com IFM igual ou superior a 60, maciez intermediária com IFM próximo a 50 e duras com IFM abaixo de 50.

Conforme pode ser observado na Tabela 2.4, todos os tratamentos apresentaram IFM superior a 60 (inclusive o controle), sendo classificadas como macias, o que pode estar relacionado às características intrínsecas ao animal do qual foi retirado o corte cárneo, como genética, raça, idade, sexo e alimentação (ALVES et al., 2005).

Quando comparado ao controle, na Figura 6 nota-se que o tratamento com a protease purificada de *Aspergillus tamaris* URM4634 apresentou o maior valor de Índice de Fragmentação Relativo (292,0%), seguido por extrato bruto (252,5%), papaína (214,2%), demonstrando que o tratamento capaz de conferir a maior maciez foi o que continha a protease purificada.

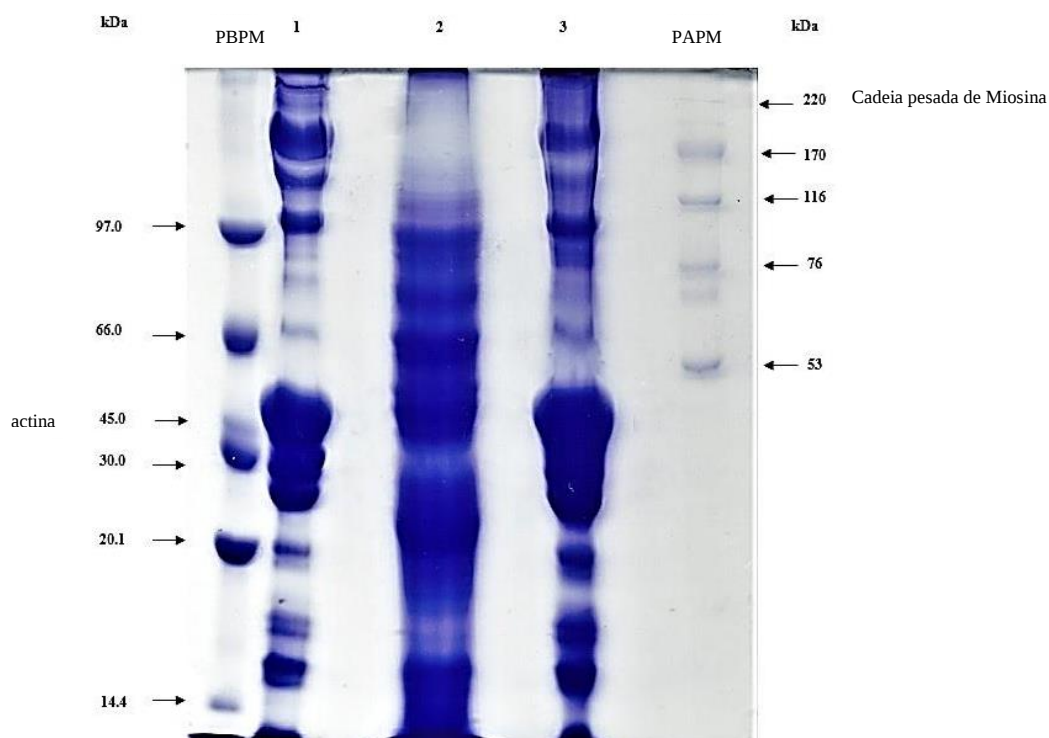
Chen et al. (2006) reportaram resultados semelhantes em seus estudos onde avaliou os efeitos de uma elastase obtida de *Bacillus* na tenderização de carnes bovinas,

analisando a variação do IFM ao decorrer do tempo, obteve maiores valores relativos de IFM para a protease purificada (230-240%) quando comparada ao tratamento controle (100-111%) ao término de 72h de tratamento.

3.5.3 Padrão de digestão miofibrilar

Para continuar investigando o comportamento da protease purificada no processo de tenderização da carne bovina, foi realizado um Padrão de Digestão Miofibrilar através de SDS-PAGE conforme pode ser observado na Figura 2.7, comparando a ação da protease purificada (2) com a amostra controle (1) e papaína (3).

Figura 2.7 Análise SDS-PAGE dos Padrões de Digestão Miofibrilar tratadas com protease purificada e papaína em água destilada a 37°C durante 1h.



****PBPM:** Padrão de baixo peso molecular (actina); **PAPM:** Padrão de alto peso molecular (miosina); Linha 1: Proteína miofibrilar incubada na ausência de enzima; Linha 2: Proteína miofibrilar tratada com a protease pura; Linha 3: Proteína miofibrilar tratada com enzima comercial (Papaína).

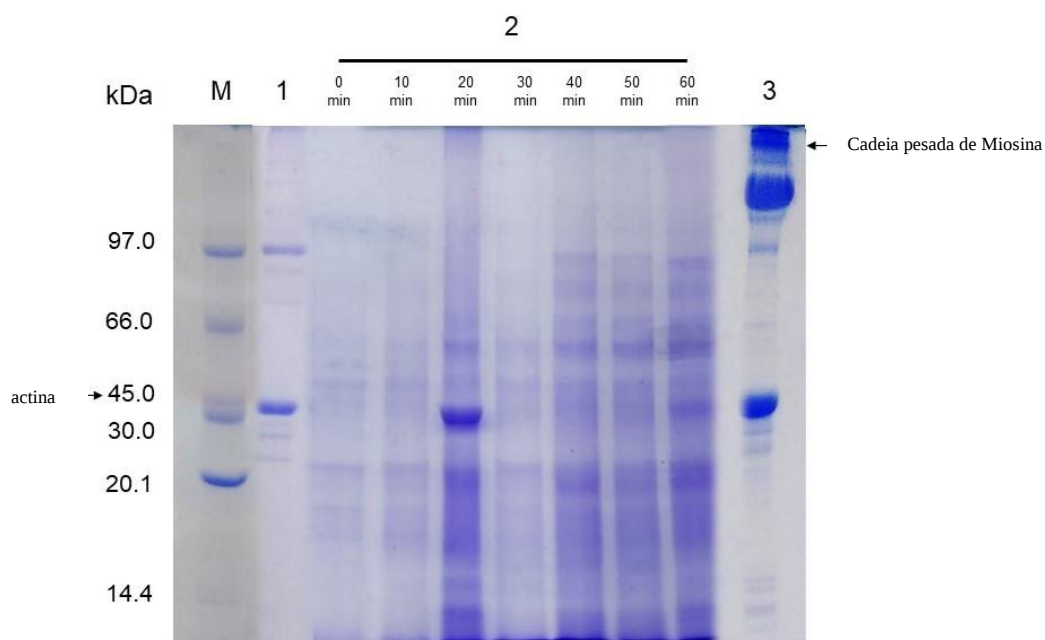
A cadeia pesada da miosina tem um peso molecular em torno de 220 kDa, e a cadeia leve da actina aproximadamente 45 kDa. Conforme pode ser observado na Figura 2.7, quando as amostras foram tratadas com a protease purificada a 37°C durante 1h houve uma forte degradação das proteínas miofibrilares estudadas (actina e miosina), liberando fragmentos com pesos moleculares menores, destacando a notável hidrólise da cadeia pesada

da miosina. Já na amostra tratada com a protease comercial (papaína), não foi observado uma degradação eficiente dos padrões actina e miosina, refletindo a baixa eficiência dessa enzima no processo de tenderização de carnes.

Segundo Santos (2007), a troponina é uma proteína miofibrilar associada à cadeia leve de actina, com peso molecular entre 28-32 kDa, o que sugere também a sua degradação, em virtude da ocorrência da hidrólise nessa região de baixo peso molecular. Zhao et al (2012) apresentou resultados semelhantes ao observado neste estudo, porém a protease purificada obtida pelo autor não foi eficiente em hidrolisar a cadeia leve da actina.

Ainda na análise do Padrão de Digestão Miofibrilar da protease purificada, foi estudado o comportamento dessa enzima em diferentes tempos (0-60 min) tanto na temperatura de armazenamento (refrigeração - 4°C) quanto no aquecimento (37°C), conforme pode ser observado nas Figuras 2.8 e 2.9, respectivamente.

Figura 2.8 Padrão de digestão miofibrilar da protease purificada de *Aspergillus tamarii* URM4634 em diferentes tempos a 4°C.



*** M: Padrão de baixo peso molecular (actina); Linha 1: Proteína miofibrilar sem qualquer tratamento; Linha 2: Digestão de 0,5 mg de proteínas miofibrilares incubadas com protease purificada durante 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60, respectivamente; Linha 3: Padrão de alto peso molecular (miosina).

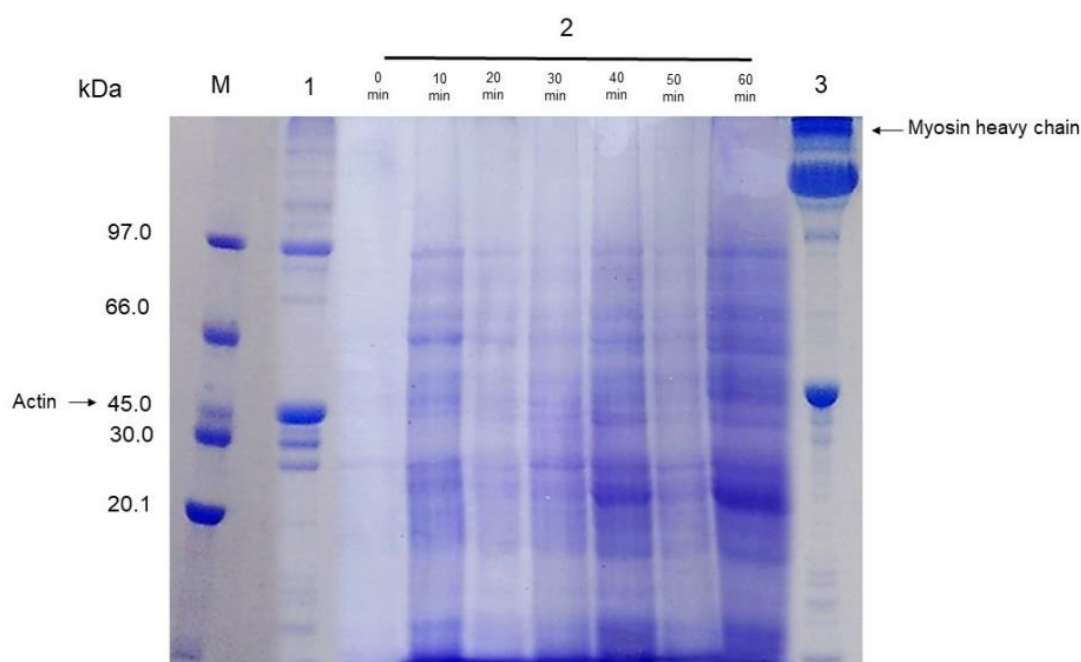
Na Figura 2.8, é possível observar a hidrólise das proteínas miofibrilares na temperatura de refrigeração, em que as reações de degradação se iniciam desde a primeira interação da amostra com a protease (tempo 0) e tornam-se cada vez mais intensas no decorrer do tempo analisado, o que pode ser observado pela intensificação de cor ao longo do tempo

pela eletroforese. Observa-se ainda que a actina só foi liberada a partir de 20 min de reação, sendo degradada em seguida, o que pode ser explicado pelo fato de que essa proteína miofibrilar necessita que os canais de Ca^{2+} dependentes estejam ativos para que ocorra a sua liberação, no entanto, o transporte ativo desses íons no retículo endoplasmático é reduzido em baixas temperaturas (GORDON; HOMSHER; REGNIER, 2000)

Na temperatura de aquecimento (Figura 2.9) foi observado um comportamento similar ao que ocorreu na refrigeração, em que no decorrer no tratamento foi possível obter a hidrólise tanto da actina, quanto da miosina, mostrando-se mais intensa ao término do tratamento (t=60 min) pela maior liberação de peptídeos.

Os padrões obtidos para ambas as temperaturas avaliadas demonstram que a protease purificada é capaz de hidrolisar as proteínas miofibrilares, demonstrando que a sua aplicação pode ser realizada tanto em condições de armazenamento quanto no próprio aquecimento da carne.

Figura 2.9: Padrão de digestão miofibrilar da protease de *A. tamaritii* purificada em diferentes tempos a 37°C.



**M: Padrão de baixo peso molecular (actina); Linha 1: Proteína miofibrilar sem qualquer tratamento; Linha 2: Digestão de 0,5 mg de proteínas miofibrilares incubadas com protease purificada durante 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60, respectivamente; Linha 3: Padrão de alto peso molecular (miosina)

3.5.4 Análise histológica

As imagens histológicas das amostras de carne estão apresentadas nas Figuras 2.10. e 2.11 em diferentes resoluções. É possível observar nas Figuras 2.10A e 2.11A que a amostra controle demonstrou a preservação do tecido, pela presença de estreitos espaços na estrutura além apresentar as linhas Z de forma intacta. Todas as amostras que receberam tratamentos enzimáticos exibiram danos na estrutura do tecido, sendo a intensidade do dano diretamente relacionado à eficiência da protease. Nas Figuras 2.10B e 2.11B está apresentada a amostra que recebeu o tratamento com extrato bruto, onde é possível observar maiores espaços intracelulares quando comparada à amostra controle, além de exibir não uniformidade nas Linhas Z e pequenas estruturas de aparência pregada pelas fraturas na membrana celular. O tratamento que recebeu a protease purificada (Figuras 2.10C e 2.11C) demonstrou resultados similares ao extrato bruto, porém com uma intensidade de degradação maior que todos os outros tratamentos, pela presença de maiores espaços intracelulares e fibras musculares com aspecto pregado mais intenso, sugerindo assim nesse tratamento uma maior hidrólise proteica. As Figura 2.10D e 2.11D apresentam os resultados para amostra tratada com protease comercial (papaína) em que demonstrou leves alterações nos tecidos, preservando o músculo, demonstrando assim uma menor especificidade quando comparada a protease purificada.

A partir desses resultados em concordância com todas as análises anteriormente realizadas, é possível sugerir que a protease purificada possibilitou um maior amaciamento da carne em função do desprendimento das fibras musculares.

Figura 2.10: Imagens de microscopia de luz de amostras de bovinos com resolução de 100x: secção longitudinal do controle (A); corte longitudinal de amostra tratada com extrato bruto (B); corte longitudinal de amostra tratada com protease purificada (C); Seção longitudinal de amostra tratada com papaína comercial.

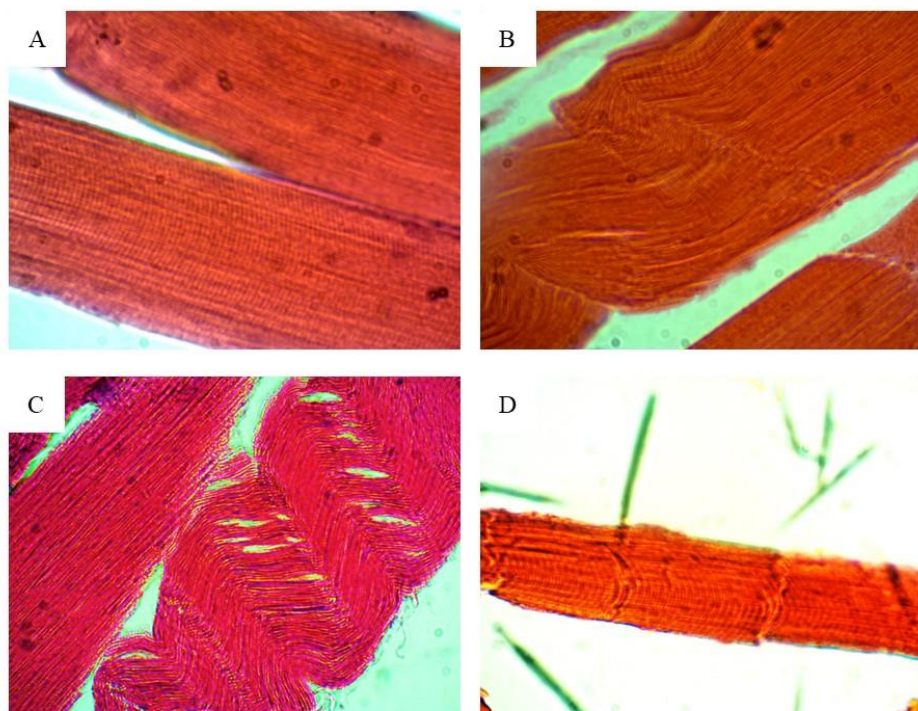
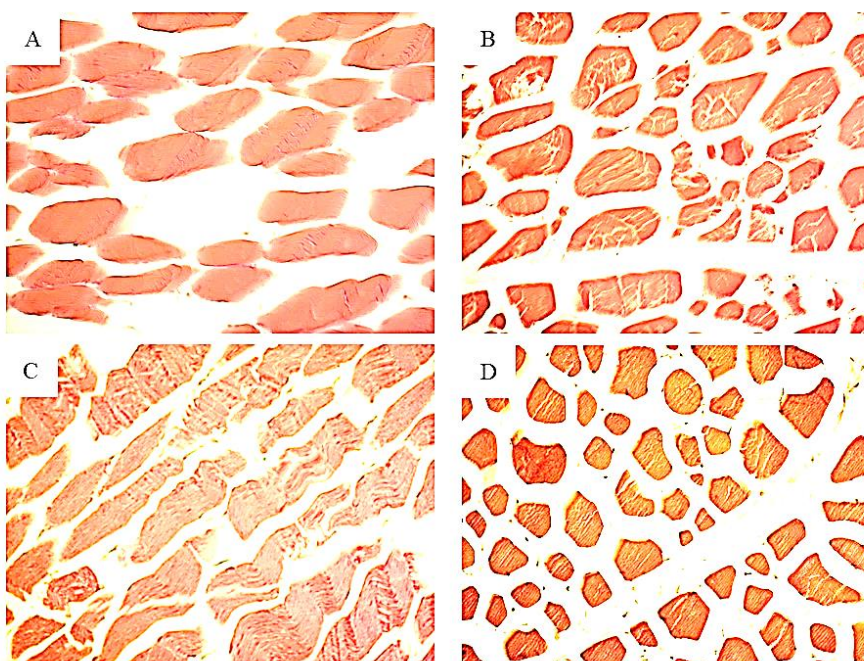


Figura 2.11: Imagens de microscopia de luz de amostras de bovinos com resolução de 40x: secção longitudinal do controle (A); corte longitudinal de amostra tratada com extrato bruto (B); corte longitudinal de amostra tratada com protease purificada (C); Seção longitudinal de amostra tratada com papaína comercial.



4. CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos por esse trabalho, é possível concluir que a fermentação em estado sólido com *Aspergillus tamaritii* URM 4634 possibilitou a obtenção de um extrato bruto com alta atividade colagenolítica (296,6 U/mL) demonstrando a potencialidade da aplicação dessa protease no amaciamento de carnes.

O extrato bruto pode ser purificado por cromatografia de troca iônica obtendo um fator de purificação de 6,28 vezes, uma atividade específica de 459,03 U/mg e uma recuperação de 45,4%,

A protease purificada se mostrou estável em concentrações de NaCl entre 0,2 e 0,4 M, com uma atividade residual máxima de 85,8% em 0,4 M correspondente a atividade proteásica de 37,16 U/mL.

Ao testar os efeitos da temperatura e pH sobre a atividade proteásica da enzima purificada, foi possível constatar que essas variáveis apresentam influências significativas. Quanto à atividade colagenolítica, as variáveis analisadas não demonstraram efeitos significativos. Entretanto, a collagenase apresentou melhores atividades na temperatura de 50°C e pH 9,0.

O processo de tenderização demonstrou a forte potencialidade da collagenase obtida no amaciamento de carnes, observado pela alta ação dessa enzima no IFM, Padrão de Digestão Miofibrilar, análise dos cortes histológicos e pela maior perda de água quando comparada aos outros tratamentos, decorrente da alta degradação das proteínas miofibrilares.

5. REFERÊNCIAS

- AISSAOUI, N.; ABIDI, F.; MAHAT, S.; MARZOUKI, N. Purification and bioactive peptides production. **J. Basic Microbiol.**, v. 54, p. 1–12, 2014.
- ALVES, D. D.; TONISSI, R. H.; GOES, B.; MANCIO, A. B. Maciez da carne bovina. **Ciência Animal Brasileira** v. 6, n. 3, p. 135-149, 2005.
- BABU, B. R.; RASTOGI, N. K.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Liquid-liquid extraction of bromelain and polyphenol oxidase using aqueous two-phase system. **Chemical Engineering and Processing**, v. 47, p. 83-89, 2008.
- BARBETTA, P. V.; GRIGIO, R. **Influência do tempo e do tipo de papel na metodologia de capacidade de retenção de água (CRA) por compressão de hamm.** Trabalho de Conclusão de Curso. 2014. 34f. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina..
- BENITO, M. J.; RODRIGUEZ, M.; NUNEZ, F.; ASENSIO, M. A.; BERMUDEZ, M. E. Purification and characterization of extracellular protease from *Penicillium chrysogenum* active against meat protein. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 3532-3536, 2002.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.. Bioquímica. 6 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6 ed., 2007.
- BOBBIO, P. A., **Química do Processamento de Alimentos**, 3ª edição. São Paulo: Editora Varela, 2001, 143p.
- BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. 2001. **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 1 ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 288p. 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analy. Bioch.**, v. 72, p. 248–54, 1976.
- CHAVIRA, R.; BURNETT T. J.; HAGEMAN J. H.; Assaying Proteinases with Azocoll; **Analytical Biochemistry**, 136, p. 446-450; 1984.

CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.-L.; LORIENT, D. **Proteínas alimentarias**. Zaragoza: Acribia, 1989. p. 179-220; 291-335.

CHEN, Q. H.; HE, G. Q.; JIAO, Y. C.; NI, H. Effects of elastase from a *Bacillus* strain on the tenderization of beef meat. **Food Chemistry**, v. 98, p. 624–629, 2006.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006. 452p.

CORAL G, ARIKAN B, UNALDI MN, GUVENMEZ H. Thermostable alkaline protease produced by an *Aspergillus niger* strain. **Ann Microbiol** 53(4):491–498, (2003).

CULLER, R. D.; PARRISH Jr, F. C.; SMITH, G. C.; CROSS, H. R. Relationship of myofibril fragmentation index to certain chemical physical and sensory characteristics of bovine longissimus muscle. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1177-1180, 1978.

DINI, C. M. **Produção, purificação e caracterização de proteases de *Thermomucor indiciae-seudaticae* N31 e avaliação de sua aplicação na fabricação de queijo maturado**. Tese (doutorado). 2010. 130f. Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto.

DUARTE, C. A. L. **Produção, Caracterização e Purificação da Colagenase do *Penicillium aurantiogriseum* URM- 4622, Visando Sua Aplicação na Produção de Peptídeos do Colágeno**. Tese (Doutorado). 2012. 146f. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

FERRO, L.A. **Produção, purificação e caracterização da enzima β -1,3 glucanase de *Cellulomonas cellulans* YLM-B191-1 e ação da enzima na parede celular de leveduras**. Tese (Doutorado), 2002. 175f. Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GINTHER, C. L. Sporulation and the production of serine protease and cephamycin C by *Streptomyces lactamdurans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 15, 522-526, 1979.

GORDON, A. M.; HOMSHER, E.; REGNIER, M. Regulation of contraction in striated muscle. **Physiol Rev.**2000;n. 80, v.2,p:853-924.2000.

ISHIHARA, Y. M.; MADRUGA, M. S. Indicadores de maciez em carnes salgadas e dessecadas: uma revisão. **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, suplemento 2, p. 3721-3738, Londrina-PA, 2013

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, L. L. M. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LAMETSCH, R.; KNUDSEN, J.C.; ERTBJERG, P.; OKSBJERG, N. THERLILDSEN, M. Novel method for determination of myofibril fragmentation post-mortem. **Meat Science** , v. 75 , p. 719–724, 2007.

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

LIMA, L. A.; CRUZ FILHO, R. F.; SANTOS, J. G.; SILVA, W. C. Produção de protease colagenolítica por *Bacillus stearothermophilus* de solo amazônico. **Ver. ACTA Amazonica**. V. 44, ed. 4, p. 403 – 410, 2014.

LIMA, S. L. T.; JESUS, M. B.; SOUSA, R. R. R.; OKAMOTO, A. K.; LIMA, R.; FRACETO, L.F. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. **Quím Nova Esc.** 28: p. 47-9. 2008.

LIU, L.; MA, M.; CAI, ZHAOXIA, C.; YANG, X.; WANG, W. Purification and Properties of a Collagenolytic Protease Produced by *Bacillus cereus* MBL13 Strain. **Food Technol. Biotechnol.** v. 48, ed. 2: p. 151–160, 2010.

MARINO, R.; MALVA, D.; ALBENZIO, M. Proteolytic changes of myofibrillar proteins in Podolian meat during aging: focusing on tenderness. **Journal of Animal. Science.** v. 93. p:1376–1387, 2015.

NASCIMENTO, T. P. **Produção de Proteases com Atividade Fibrinolítica por Fungos Filamentosos de Solos da Caatinga Utilizando Fermentação em Estado Sólido.** Dissertação (Mestrado). 2014. 129f. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por Fungos e Aplicações. **Ver. Saúde e Biol.**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PAPAGIANNI, M.; SERGEDELIS, D. Purification and Biochemical Characterization of a Novel Alkaline Protease Produced by *Penicillium nalgiovense*. **Appl Biochem Biotechnol**. DOI 10.1007/s12010-014-0824-3. 2014.

PINTO, G. A. S.; BRITO, E. S.; ANDRADE, A. M. R.; FRAGA, S. L. P.; TEIXEIRA, R. B. Fermentação em Estado Sólido: Uma Alternativa para o Aproveitamento e Valorização de Resíduos Agroindustriais Tropicais. **Comunicado Técnico** (EMBRAPA). Fortaleza-CE, 2005.

RACHEAL, O. O.; AHMED, A. T. F.; NDIGWE, E. V.; MORAKINYO, S. D. Extraction, purification and characterization of protease from *Aspergillus Niger* isolated from yam peels. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, v. 4, ed. 2: p. 125-131, 2015.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

READDY, L.V.A.; WEE, Y.J.; YUN, J.S.; RYU, H.W. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches, **Bioresource Technology**, v. 99, p.: 2242–2249. 2008.

SAKURAI, Y. H.; INOUE, W.; NISHI, W.; TAKAHASHI, T.; LINO, M.; YAMOTO, M, TAKAHASHI, K. Purification and characterization of a major collagenase from *Streptomyces purvulus*. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 73, p. 21-28, 2009.

SANTOS, C. C. **Mecanismos Adaptativos em Frangos Submetidos a estresse químico agudo pré abate e suas implicações na funcionalidade protéica muscular**. Dissertação (mestrado). 2007. 57 f. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba.

SCHULZE, M.; MASCHKE, U.; MONKS, K. Separação de duas proteínas com cromatografia de troca iônica (IEC). **Science Together**. 2018.

SILVA, O. S. **Produção de proteases por linhagens de *Aspergillus* e extração em sistema de duas fases aquosas**. Dissertação (mestrado). 110 f. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife. 2014.

SILVA, O. S.; LAURENTINO, T. N. S.; OLIVEIRA, R. L.; PORTO, T. S. Caracterização Parcial de Proteases por *Aspergillus tamarii* URM 4634 por Fermentação em Estado Sólido (FES). In: **Anais do 20º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis-SC, 2014.

SILVA, O. S.; OLIVEIRA, R. L.; SOUZA-MOTTA, C. M.; PORTO, A. L. F.; PORTO, T. S. Novel Protease from *Aspergillus tamarii* URM4634: Production and Characterization Using Inexpensive Agroindustrial Substrates by Solid-State Fermentation. **Advances in Enzyme Research**, 4, p. 125-143, 2016.

SILVA, T. H. L.; SILVA, O. S.; PLENTZ, K. S. O.; MELO, A. H. F.; PORTO, T. S. Produção de Colagenases por *Aspergillus* UCP 1276 em Fermentação Submersa e Precipitação em Sulfato de Amônio. In: **Anais do 21º Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Fortaleza-CE, 2016.

SOUZA, P. M. **Produção de Proteases por Fungos Filamentosos Isolados do Cerrado do Centro-oeste Brasileiro**. Tese (Doutorado). 2015, 125f. Universidade de São Paulo. São Paulo.

SUPHATHARAPRATEEP, W.; CHEIRSILP, B.; JONGJAREONRAK, A. Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction. **New Biotechnology**, 28: 649-655. 2011.

SUHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B.; VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. Characterstics of collagenolytic enzymes secreted by Deuteromycete Fungi *Aspergillus Flavus*. **Immunology and Microbiology**. v. 125, p. 447-451, 2003.

ZHANG, J. Protein-Protein Interactions in Salt Solutions, **Protein-Protein Interactions - Computational and Experimental Tools**, 2012. ISBN: 978-953-51-0397-4, InTech, Disponível em:<<http://www.intechopen.com/books/protein-protein-interactions-computational-and-experimentaltools/protein-protein-interactions-in-salt-solutions>> Acesso em: 09 de março de 2017.

ZHAO, G. Y.; ZHOU, M. Y. ZHAO, H. L.; CHEN, X. L.; XIE, B. B.; ZHANG, X. Y.; HE, H. L.; ZHOU, B. C.; ZHANG, Y. Z. Tenderization effect of cold-adapted collagenolytic protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1738–1744, 2012.

ANEXO A - CAPA DO ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES

International Journal of Biological Macromolecules 117 (2018) 1081–1088



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>



Purification and characterization of a novel extracellular serine-protease with collagenolytic activity from *Aspergillus tamaritii* URM4634



Osmar Soares da Silva^a, Elizane Melo de Almeida^b, Allan Henrique Félix de Melo^b, Tatiana Souza Porto^{b,*}

^a Northeast Biotechnology Network (RENORBIQ), Federal Rural University of Pernambuco (URPE), Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife, PE, Brazil

^b Academic Unit of Garanhuns (UAG), Federal Rural University of Pernambuco (URPE), Av. Bom Pastor, s/n, Boa Vista, 55296-901 Garanhuns, PE, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2018

Received in revised form 31 May 2018

Accepted 1 June 2018

Available online 02 June 2018

Keywords:

Protease

Aspergillus tamaritii

Liquid chromatography

ABSTRACT

An extracellular serine-protease from *Aspergillus tamaritii* URM4634 was purified and characterized. The possibility of using *Aspergillus tamaritii* URM4634 protease in detergent formulations and collagenolytic activity was investigated. The protease demonstrated excellent stability at pH range 7.0–11.0, the optimum being at pH 9.0. The enzyme was stable at 40 °C for 180 min, enhanced by Mg²⁺ and Ca²⁺, but inhibited by Zn²⁺, and strongly inhibited by phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), suggested as serine-protease. The azocasein substrate result showed Km = 0.434 mg/mL and V_{max} = 7739 mg/mL/min. SDS-PAGE and azocasein zymography showed that the purified alkaline protease (2983.8 U/mg) had a molecular mass of 49.3 kDa. The enzyme was purified by column chromatography using Sephadex A50 resin. The proteolytic activity was activated by SDS (sodium dodecyl sulfate), Tween-80, Tween-20 and Triton-100. This study demonstrated that *A. tamaritii* URM4634 protease has potent, stable and compatible collagenolytic activity to the desired level in local laundry detergent brands compared with similar enzymes produced by solid-state fermentation. This protease can thus be chosen as an option in both the food industry to tenderization meat and the detergent industry to washing process.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Proteases are proteolytic enzymes that catalyze the cleavage of peptide bonds in proteins. These enzymes form a very large and diverse group of complex enzymes which have different properties such as a substrate, an active site and a catalytic mechanism, optimal pH and a profile of stable temperatures. The specificity of protease is regulated by the nature of amino acids and others by functional group (aromatic or aliphatic or sulphur-containing) that determine the specificity of the enzyme to the substrate close to the bond being hydrolysed [1]. This group of proteases is one of three major groups of commercial industrial enzymes and about 60% of total sales worldwide are of hydrolytic enzymes [2–4].

Aspergillus tamaritii are in the order Eurotiales also comprising the genera *Penicillium*, which are known to have a potential for producing various metabolites such as antibiotics, organic acids, medicines or enzymes, milk-clotting enzymes and extracellular proteases [5]. Isolates of the so-called domesticated species, such as *A. oryzae*, *A. sojae* and *A. tamaritii* are used in oriental food fermentation processes and as hosts for heterologous gene expression [6]. These species are widely used

for protease production since several species of these genera are regarded as safe (Generally Recognized as Safe - GRAS) strains [7].

Collagenolytic proteases are proteases that degrade the collagen molecule, involved in various physiological process, such as fetal bone development, wound repair [8] and meat tenderization [9]. They are classified into two types, namely, metallo-collagenase and serine-collagenase, based on their physiological functions [10]. Proteases are now an essential component of detergents, and their use provides consumers with well proven benefits, both in the washing process itself and in terms of the wider environment. These enzymes convert their substrates into small, readily soluble fragments, which can be easily removed from fabrics. All the proteolytic enzymes found in detergents are nonspecific serine endo-proteases (e.g. subtilisin) with a preferred cleavage on the carboxyl side of hydrophobic amino acid residues, but they are able to hydrolyze most peptide links [11].

Several studies have been conducted to search for new sources of both collagenolytic and detergent-compatible properties such as bacteria [12, 13], virus [14], plants [15], fish [16], yeast [17] and other fungi [18–20]. Filamentous fungi have been shown to be appropriate choice for producing collagenolytic protease and detergent-compatible enzymes, since they produce large quantities, mainly extracellularly, of these which enables purification. The industrial demand for proteases with novel and better properties continues to prompt research work in this area. Producing proteases such as applying, purifying and

* Corresponding author.

E-mail address: tatiana.porto@ufrpe.br (T.S. Porto).