



Biociencia

PROTEASES PRODUZIDAS POR MICROORGANISMOS NA REGIÃO AMAZÔNICA

Claudiane Beatriz Alencar Pires¹, Jennifer Salgado da Fonseca², Ricardo Lima Serudo³

Resumo

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores em processos industriais e contribuem para a redução de poluentes ambientais, uma vez que são biodegradáveis. Dentre as enzimas usualmente empregadas, destacam-se as proteases que desempenham importantes funções biológicas e regulam uma série de processos fisiológicos e bioquímicos. São divididas em três grupos de acordo com algumas características, tais como a clivagem de ligação na cadeia peptídica, natureza do sítio ativo e pH específico. Os micro-organismos podem ser considerados uma fonte atrativa na produção de protease pela possibilidade de cultivo em processos fermentativos de forma a serem produzidos em um tempo reduzido e em grandes volumes. Tendo em vista que a floresta amazônica representa uma fonte de alto valor para a busca de novos extratos enzimáticos a serem explorados para a aplicação biotecnológica, o objetivo da revisão foi realizar um levantamento bibliográfico de trabalhos utilizando micro-organismos produtores de proteases na região e apontar as principais instituições que desenvolvem tais pesquisas em Manaus, tendo em vista a necessidade de reunir informações a respeito de trabalhos utilizando micro-organismos e os respectivos substratos empregados.

Palavras-Chaves: Peptidases, Região Amazônica, Fermentação.

Proteases produced by micro-organisms in the amazon region. Enzymes are known as biocatalysts in industrial processes and contribute to the reduction of environmental pollutants as they are biodegradable. Among the enzymes usually employed, we highlight the proteases that play important biological functions and regulate a series of physiological and biochemical processes. They are divided into three groups according to some characteristics, such as peptide chain cleavage, active site nature and specific pH. Microorganisms can be considered an attractive source in the production of protease by the possibility of culturing in fermentative processes so as to be produced in a reduced time and in large volumes. Considering that the Amazon forest represents a high value source for the search for new enzymatic extracts to be exploited for the biotechnological application, the objective of the review was to carry out a bibliographic survey of works using microorganisms producing proteases in the region and to point out the main institutions that carry out such research in Manaus, considering the need to gather information about work using microorganisms and the respective substrates used.

Key-words: Peptidases, Amazon Region, Fermentation.

¹ Aluna Engenharia Química EST, UEA, E-mail: beatriz18alencar@gmail.com.

² Pesquisadora no HUB – Tecnologia e Inovação, UEA, E-mail: jennifer_fonseca@hotmail.com

³ Professor Adjunto EST, UEA, rserudo@uea.edu.br



1. Introdução

As enzimas são conhecidas como biocatalisadores em processos industriais e contribuem para a redução de poluentes ambientais, uma vez que são biodegradáveis. Grande parte das enzimas atuam sob condições brandas de pH, temperatura e pressão, resultando em significativa conservação de água, equipamentos e energia para benefícios não só das indústrias, mas também do meio ambiente (KIRK et al., 2002; SAID e PIETRO, 2004; HASAN; SHAN; HAMEED, 2006; MENDES et al, 2011).

Dentre as enzimas usualmente empregadas em indústrias, destacam-se as hidrolases, com ênfase em carboidrases, lipases e proteases (GAMBÔA, 2010; BITTENCOURT, 2014). As proteases desempenham uma série de processos fisiológicos por meio do controle da síntese e degradação de proteínas, catalisando a hidrólise de aminoácidos específicos dentro de polipeptídeos (RAO et al., 1998; FARO, 2008; MORYA et al., 2012).

A nomenclatura e classificação de proteases é bastante diversa, sendo mais notável classificador, o mecanismo de reação. Geralmente, as proteases são divididas em três grupos de acordo com algumas características: ponto de clivagem na cadeia peptídica, natureza química do sítio ativo e relação evolucionária em conformidade com a estrutura (BARRET; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001; GIONGO, 2006; KONDO, 2012; SILVA, 2013).

De acordo com a posição da ligação a ser clivada (quebra da ligação peptídica), as proteases podem ser subdivididas em exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação, onde quebram os peptídeos terminais ou os peptídeos distantes dos terminais, respectivamente (RAO et al., 1998; EMBRAPA, 2009; NIRMAL et al., 2011; SOUZA, 2015). Em relação à natureza química do sítio ativo elas podem ser divididas em serino, cisteína, aspártico e metaloprotease (BARROS, 2014; HAMIN NETO, 2012).

Quanto à relação evolucionária, as proteases são divididas em famílias e subdivididas em clans, conforme a convergência ou divergência de um ancestral comum. Com base neste critério, as famílias de proteases são denominadas com uma letra, S, C, A, M e U para os tipos serina, cisteína, aspartil, metalo e não conhecidas, quanto ao tipo de catálise realizada. (RAO et al, 1998; O'BRIEN, 2001; SOUZA, 2015).

São fontes de proteases, os vegetais, animais e microorganismos (fungos, leveduras e bactérias) (NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; LADEIRA, et al., 2010; RADHA et al, 2011). Os microorganismos são excelentes fontes para a produção de enzimas, pois possuem uma enorme diversidade bioquímica e são passíveis à manipulação genética (SOUZA, 2015).

Além disso, podem crescer em meios de cultura sólidos e líquidos. Eles devem obter um bom rendimento na produção de enzima, ser de fácil cultivo e manipulação e fazerem parte de GRAS (Generally Recognized As Safe – Geralmente Reconhecidos Como Seguros) (SANDHYA et al., 2005; FERNANDES, 2009).

O Bioma amazônico constitui uma fonte de valor altíssimo para a busca de novos extratos enzimáticos a serem explorados para a aplicação biotecnológica, pois oferece uma riqueza imensurável em biodiversidade, recursos hídricos, minérios, espécies animais e vegetais, além de fungos macro e microscópicos, leveduras e bactérias disponíveis em seu bioma (CRUZ, 2010; FONSECA, 2013; PEREIRA et al., 2017).

O objetivo da revisão foi apresentar as generalidades dos mecanismos de ação das proteases e realizar um levantamento bibliográfico sobre trabalhos utilizando microorganismos capazes de produzir proteases e apontar as principais instituições de desenvolvimento e pesquisa na região Norte, tendo em vista a necessidade de reunir informações a respeito de trabalhos com microorganismos e substratos da região amazônica.

2. Material e Método

A pesquisa bibliográfica que subsidiou a presente revisão foi baseada na consulta de trabalhos publicados nos últimos 20 anos, obtidos nas seguintes bases de dados Científicos: Science Direct, SciELO, PubMed.

Como termos de busca foi utilizado: “Enzymes”, “Proteases”, “Fermentation”, “Amazon Region”, “Amazon rainforest microorganisms”, “Proteases da Amazônia”, “Fungos Amazônicos”, “Mecanismos catalíticos das proteases”.

3. Mecanismos de Reações Catalíticas das Proteases

Os mecanismos das reações catalíticas das serino e cisteíno protease envolvem os grupos funcionais de aminoácidos como a hidroxila da serina e o enxofre da sulfidril da cisteína como nucleófilos. Em relação as aspártico e metaloprotease, uma molécula de água é utilizada pelos seus respectivos resíduos catalíticos como um nucleófilo para atacar a

ligação peptídica do substrato (KONDO, 2012).

3.1 Mecanismo de ação das serinoproteases

A cadeia lateral (-CH₂-OH) da serina (Ser) é ativada pela reação de catálise básica mediada pelo aspartato (Asp) e a histidina (His) envolvendo interações por ligação de hidrogênio. A Ser é responsável pelo ataque nucleofílico à carbonila da ligação amídica do substrato e forma um oxianíon (intermediário) tetraédrico (MURI, 2013).

Por sua vez, o intermediário sofre um rompimento pela His protonada, formando uma amina e um intermediário acil-enzima. A porção N-terminal é liberada e a molécula de água (H₂O) introduzida ataca a carboxila do substrato gerando a parte C-terminal formando a acil-enzima intermediária (PILON, 2012; MURI, 2013; PORTELA, 2014). A Figura 1 apresenta o mecanismo de ação das serinoproteases.

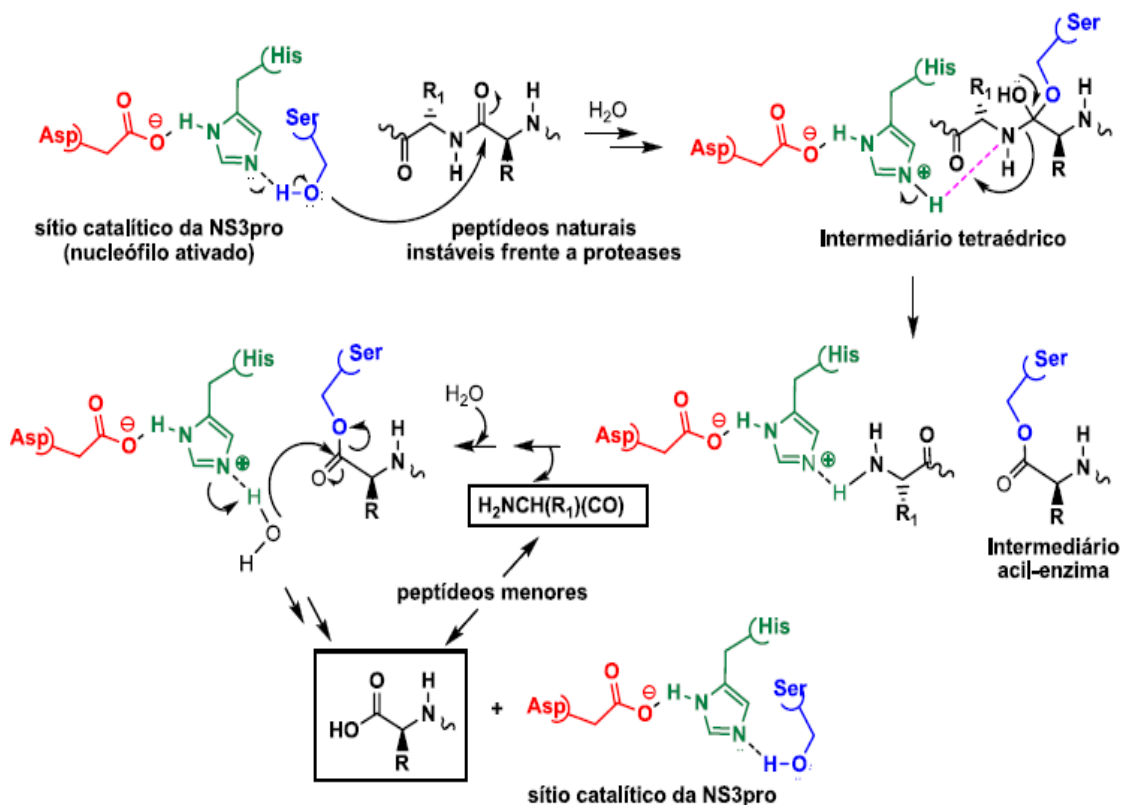


Figura 1 – Mecanismo catalítico geral das serinoproteases. Fonte: PORTELA (2014).

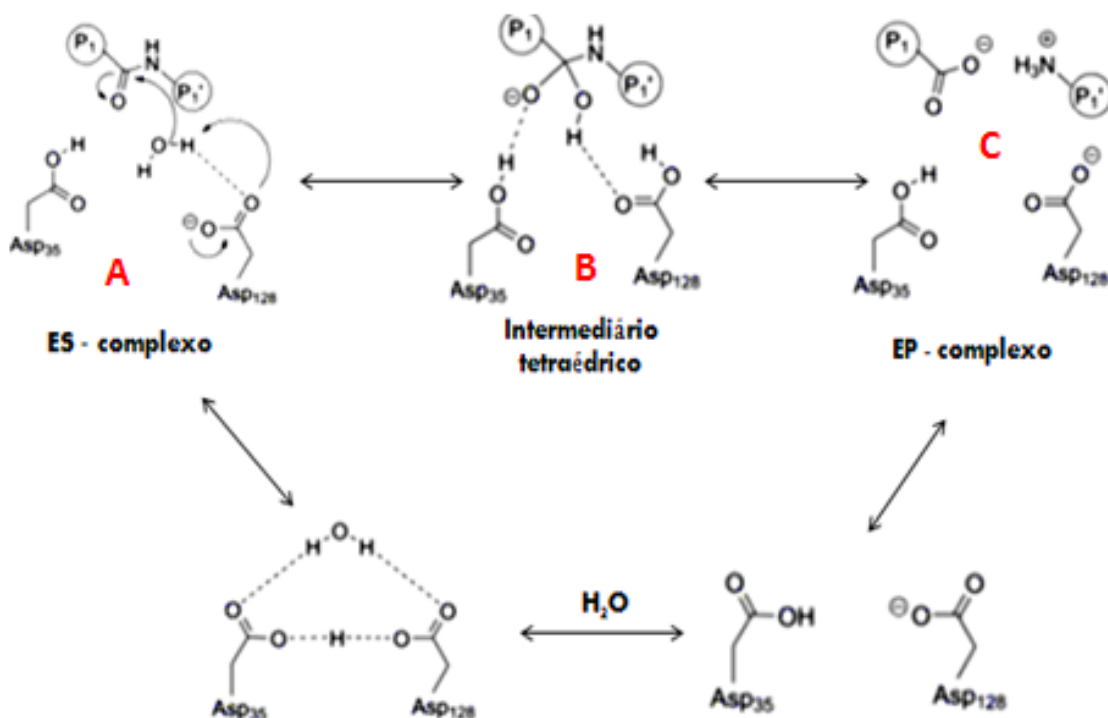
3.2 Mecanismo de ação das cisteínoproteases

O sítio ativo da cisteínoprotease é composto pela *Cis-His-Asn* (Cisteína-Histidina-Asparagina). Possui um mecanismo de ação catalítico semelhante aos da serinoproteases, e ao invés da hidroxila da serina, apresentam como nucleófilo um grupo tiol. Esta ação catalítica promove a formação de um intermediário covalente, neste caso, o éster ou tio-éster. Nas cisteínoproteases o par iônico-imidazol está presente na enzima livre e, quando o intermediário tetraédrico e o estado de transição são formados, as cargas sofrem novas orientações (DUARTE, 2008; DELLAMANO, 2009; KONDO, 2012).

3.3 Mecanismo de ação das aspárticoproteases

O mecanismo da ação das aspárticoproteases está associado à reação entre a molécula de água e os dois resíduos catalíticos de aspartato, para a díade de dois grupos carboxílicos; e a outra reação está relacionada à díade para o oxigênio carbonilo do substrato com clivagem da ligação CO–NH. Neste caso, a molécula de água age como um nucleófilo atacando o grupo carbonilo da ligação peptídica para que ocorra sua quebra. Estas ações levam a formação de um intermediário tetraédrico neutro não covalente (VEERAPANDAIN et al, 1992; SODERO; SIMONE; SILVA, 2009; HANDEM, 2013).

A Figura 3 representa um esquema ilustrativo do mecanismo das aspárticoproteases.



Fonte: HANDEM (2013).

Figura 3 – Mecanismo de catálise das aspárticoproteases onde (A) ocorre o ataque nucleofílico da água à carbonila da ligação peptídica do substrato; seguido por (B) formação de um intermediário tetraédrico pelos dois resíduos da Asp; em (C) o produto ácido e a amina são formados e o centro catalítico é restaurado à sua configuração inicial.

3.4 Mecanismo de ação das metaloproteases

Os mecanismos de catálise das metaloproteases são baseados principalmente em estudos realizados com a termolisina e carboxipeptidase A (KONDO, 2012).

Um dos mecanismos catalíticos propostos para a termolisina (Figura 4) é de que o glutamato atua como um receptor de próton quando ocorre a reação de catálise. No começo da reação (A), o carbono da carbonila da ligação peptídica é atacado por uma molécula de água ativada (íon hidróxido). Na reação B, o oxigênio é então situado entre *His* (histidina) e *Tyr* (tirosina)

e a molécula de água fica perto do cátion zinco e se desloca em direção a *Glu* (glutamato), promovendo a formação de um intermediário enquanto o zinco fica na forma complexada (zinco pentacoordenado) (STÖCKER e BODE, 1995; AKAO, 2011; KONDO, 2012).

A ligação C-N é clivada, e o *Glu* atua como ácido, doando um próton e ocorre liberação da parte N-terminal (C). Em (D), os resíduos *Asn*112 (asparagina) e *Ala*113 (alanina) formam pontes de hidrogênio e uma segunda transferência de próton realizado pelo *Glu* libera o produto C-terminal da reação catalítica (GONG et al., 1998; KONDO, 2012).

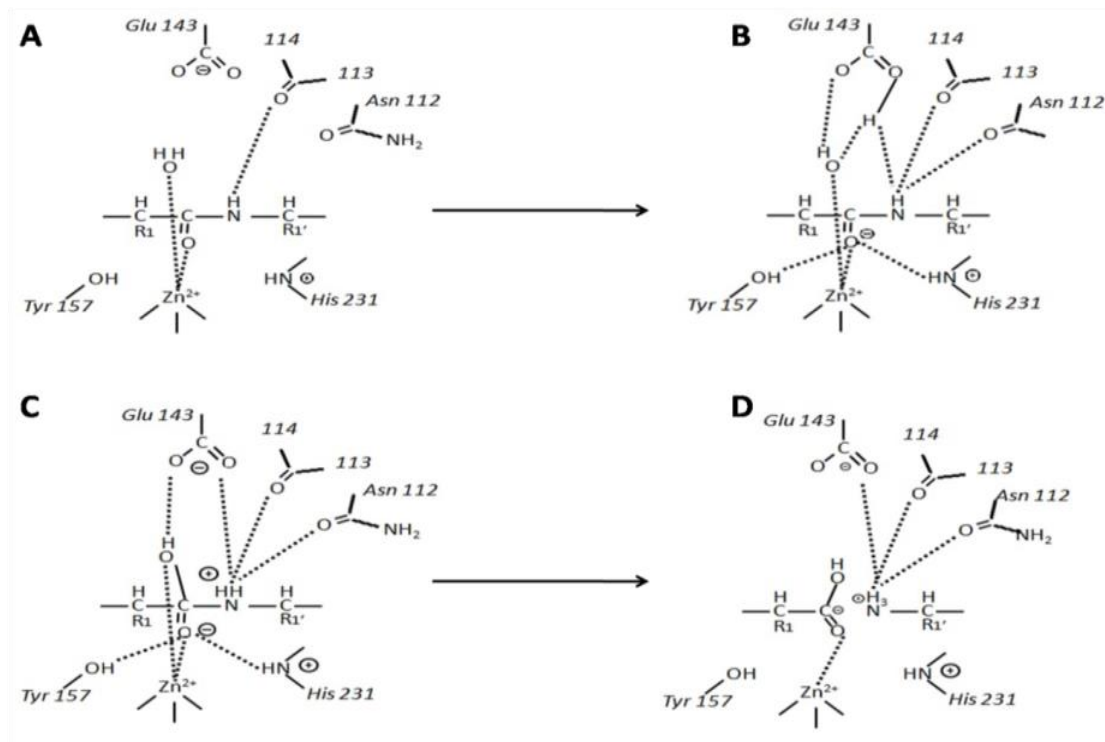


Figura 4 – Mecanismo de catálise das metaloproteases onde (A) ocorre o ataque do íon hidróxido no carbono da ligação peptídica; seguido pela formação de um intermediário e o complexo de zinco (B). (C) Há liberação do grupamento N-terminal, seguida da (D) formação de pontes de hidrogênio nos resíduos *Asn*₁₁₂ e *Ala*₁₁₃. Fonte: Adaptado de KONDO (2012).

4. Processos fermentativos para produção de proteases

Os processos de fermentação para a produção de protease podem ser de dois tipos: a Fermentação no Estado Sólido (FES)

e a Fermentação Submersa (FS) (PANDEY, 2003, SANDHYA et al., 2005; GIONGO, 2006).

A FES consiste em um processo cujo crescimento microbiano e formação do



produto ocorre em substratos sólidos com reduzida quantidade de água livre. Geralmente, os substratos mais utilizados são o arroz, o trigo, cevada, milho e soja (BON; FERRARA; CORVO, 2008; ROCHA, 2010; BITTENCOURT, 2014; CAPRARA, 2015).

O meio para FES é simples, composto de substratos sólidos que atuam como fonte de carbono e energia, consome menos energia, apresenta baixo grau de umidade e não forma espuma, além de apresentar a vantagem da estabilidade da enzima excretada (BON; FERRARA; CORVO, 2008; SHINGHANIA et al., 2009).

No entanto, o processo de fermentação em estado sólido apresenta algumas desvantagens: menor acessibilidade ao substrato, problemas de transferência de massa e do controle das variáveis físico-químicas como o pH, a temperatura, oxigênio e grau de mistura, além de dificuldades em transformar da escala de laboratório para a industrial (COUTO e SANROMÁN, 2005; BON; FERRARA; CORVO, 2008; ORLANDELLI et al., 2012).

Por outro lado, a fermentação submersa consiste no uso de um meio de cultivo líquido, contendo nutrientes disponíveis para os micro-organismos, onde serão submetidos a condições fisiológicas ótimas para que se desenvolvam e produzam diversas enzimas, metabólitos, antibióticos e colorantes (GIBBS, 2006; SINHA e SINHA, 2009).

A célula produtora se desenvolve sob agitação mecânica e todos os parâmetros do processo como o pH, a temperatura, o consumo de oxigênio e a formação de CO₂ são medidos e controlados rigidamente (LAMBERT; MEERS, 1983; MCNEIL; HARVEY, 1990; EUROPEAN COMMISSION, 2002).

A FS apresenta como vantagem a facilidade de produzir biocompostos com grandes volumes de meio, distribuição uniforme dos nutrientes, excreção de metabólitos e redução de tempo no processo. Como fatores limitantes no processo podem

ser citados: alto custo com aeração e agitação, principalmente quando o meio reacional possui complexa reologia e elevada viscosidade e formação de espuma (BON; FERRARA; CORVO, 2008; SILVA, 2013).

5. Aplicação Industrial de Enzimas

Foi estimado que, a demanda global de enzima em 2013 era de 4,4 bilhões de dólares, e acredita-se que o mercado global de enzimas deve alcançar em 2020 cerca de 7,652 bilhões de dólares baseado em um estudo da Grand View Research, Inc. As indústrias de alimentos e bebidas, detergentes e de ração de animais são responsáveis pelo crescimento do mercado (BRITO, 2015; SOUZA, 2015).

As proteases possuem um potencial imenso para uso no âmbito industrial. É muito aplicada na formulação de detergentes, produtos farmacêuticos, processamento de couro, na indústria alimentícia entre outros (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; GIONGO, 2006; VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2010; RAI e MUKHERJEE, 2011).

A relevância dessas enzimas reflete-se a sua rica diversidade estrutural e mecanismos de ação que agregam valor nas mais diversas aplicações industriais. Em consequência, o interesse na busca por enzimas proteolíticas com adequada especificidade e estabilidade ao pH, temperatura e agentes químicos continuam a motivar as pesquisas por novas fontes (ZANPHORLIN et al., 2011; AISSAOUI et al., 2014).

O uso de enzimas proteolíticas como aditivos em formulações de detergentes tem por finalidade a remoção de manchas e resíduos proteicos derivados de sangue, leite, ovo e carne. Além disso, conferem caráter biodegradável ao produto e aumentam o desempenho e diminuem os custos do processo (RAO et al, 1998; KUMAR e TAKAGI, 1999; HADDAR et al., 2009; ESPÓSITO, 2010).

Em aplicações de proteases na indústria farmacêutica destacam-se as collagenases, queratinases e elastases que são



Biotecnologia

utilizadas como auxiliares na digestão, combinações com antibióticos e tratamentos de lesões. Porém, são produzidas em pequenas quantidades, pois requerem alto grau de pureza (TSURUOKA et al., 2003; GUPTA e RAMNANI, 2006; HAMIN NETO. 2012).

As proteases também podem auxiliar a remoção de pelos na indústria de couros. Proteases alcalinas são utilizadas para substituir produtos químicos como sulfeto de sódio que são tóxicos ao meio ambiente. Elas atuam na quebra seletiva de tecido queratina no folículo sem afetar a resistência à tração de couro (MACEDO et al., 2005; GUPTA e RAMNANI, 2006; ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011).

Na indústria alimentícia, as proteases, exercem papel no amaciamento de carnes, com a função de hidrolisar proteínas; são utilizadas em laticínios, massas, fabricação de pães e clarificação de cervejas (RAO et al., 1998; KUMAR e TAKAGI, 1999; THIS, 2004).

6. Principais Instituições de Pesquisa na cidade de Manaus

O censo de 2010 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPQ) registrou 265 grupos de pesquisa no Brasil que investigam microorganismo. Do total de grupos de pesquisas existente no país, 16 grupos se encontram na região Amazônica. Destes, apenas dois realizam estudos da composição química da microbiota e quatro desenvolvem processos aplicados à biotecnologia (PEREIRA et al, 2017).

O restante está focado em investigar características de biodiversidade microbiana ou aplicação em produtos agrônomo e terapêutico. O censo de 2015 revela a expansão de mais de 100 grupos que trabalham com microorganismos no Brasil, no entanto, estes grupos ainda não foram divulgados (PEREIRA et al, 2017).

As pesquisas sobre microorganismos na Amazônia são desenvolvidas por instituições de pesquisa representadas, principalmente, pela

Universidade do Federal do Amazonas (UFAM), Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), Instituto Leonidas e Maria Deane (ILMD) – FIOCRUZ e Embrapa Amazônica Ocidental - EMBRAPA (PEREIRA et al., 2017).

A UFAM promove desenvolvimento regional através do Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), órgão suplementar criado em 22 de maio de 1997 e integra a estrutura do Parque Científico e Tecnológico da UFAM e está dividido em Biotecnologia e Central Analítica (UFAM, 2015).

A finalidade do órgão é disponibilizar instrumentos para estudos multidisciplinares, viabilizando a criação, aquisição e a difusão de conhecimentos científicos em Química, Biologia, Geologia, Biotecnologia, Engenharia de Materiais e Medicina são realizadas na estrutura do órgão (UFAM, 2015).

Um ponto forte do trabalho desenvolvido pelo grupo é a Rede Genômica da Amazônia, cujo foco é desenvolver processos de interesse industrial. A Conservação, Manejo Florestal, Biorremediação e Saúde (estudos epidemiológicos) são temas constantes nas pesquisas fomentadas pelo CAM (UFAM, 2015).

Em março de 2017, o Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) completou 15 anos de contribuições para o desenvolvimento da pesquisa e da inovação na UFAM. Inicialmente, o programa buscou consolidar os estudos e a compreensão da biodiversidade para uso sustentável na Amazônia Ocidental e na Amazônia Brasileira a criar uma base para a formação de recursos humanos na área biotecnológica, tornando-se referência na região Norte e, ainda, contribuindo para a expansão da pós-graduação na universidade (UFAM, 2017).

Depois de implantar o PPG-Biotec, surgiu a Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal (Bionorte) com a proposta de formar pessoal qualificado de alto nível para atuar em



Biociencia

instituições de ensino e pesquisa na região (UFAM, 2015).

Sendo assim, a Rede BIONORTE congrega instituições da Amazônia Legal cujo objetivo é a formação de recursos humanos e integração de competências para o desenvolvimento de projetos de pesquisa e inovação com foco em três linhas de pesquisa: biodiversidade amazônica; uso sustentável da biodiversidade e bioprospecção e desenvolvimento de bioprodutos e bioprocessos (BIONORTE, 2017).

Em 2014, a UEA implantou o programa de pós-graduação de mestrado em Biociencia e Recursos Naturais com duas linhas de pesquisa: Conservação e uso sustentável da biodiversidade; Bioprospecção, Bioprocessos e Bioprodutos (UEA, 2017).

O programa possui o intuito de qualificar profissionais para atuação nas áreas de ensino, pesquisa, extensão, inovação e gestão para a geração de novos conhecimentos e utilização potencial dos recursos naturais da Amazônia e melhorar a produtividade e qualidade de bioprodutos por meio da aplicação de técnicas de engenharia genética, processos fermentativos, cultivo de células animais e vegetais e outros processos tecnológicos (UEA, 2017).

Para manutenção e suporte técnico-científico e desenvolvimento de pesquisas, a UEA mantém convênio com diversas instituições como o Centro de Biociencia da Amazônia- CBA, EMBRAPA, a Fundação de Medicina Tropical do Amazonas – FMT, a Fundação de hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM e o INPA (UEA, 2017).

O CBA é um centro tecnológico que visa contribuir para o desenvolvimento da bioindústria no país, para a geração de conhecimento e de tecnologia de ponta, funcionando como um elo entre diversas instâncias governamentais, setor produtivo e comunidade científica (INMETRO, 2017).

O centro foi criado no âmbito do Ministério do Meio Ambiente (MMA), sendo gerido inicialmente pela

Superintendência da Zona Franca de Manaus (Suframa). Em 2015, o Inmetro assumiu a administração do CBA, a partir da assinatura de um Termo de Execução Descentralizada (INMETRO, 2017).

Segundo o pesquisador da Diretoria Aplicada às Ciências da Vida (Dimav), José Mauro Granjeiro, o trabalho é voltado atualmente para prestação de serviço qualificado para a Amazônia, na identificação, na caracterização e na qualificação dos potenciais produtos da região (INMETRO, 2017).

A EMBRAPA é uma unidade de pesquisa ecorregional que se dedica a buscar soluções de pesquisa, desenvolvimento e inovação aplicadas a estudos em aquicultura, culturas alimentares e agroindustriais, cultivo em plantas medicinais e condimentares, olericultura, sivilicultura e manejo florestal visando o aumento da produtividade da agricultura no Amazonas de modo a preservar os recursos naturais e a biodiversidade (EMBRAPA, 2017).

Na FIOCRUZ são executados mais de mil projetos de pesquisa e desenvolvimento tecnológico, que produzem conhecimentos para o controle de doenças como Aids, malária, Chagas, tuberculose, hanseníase, sarampo, rubéola, esquistossomose, meningites e hepatites, além de outros temas ligados à saúde coletiva, entre os quais a violência e as mudanças climáticas, e à história da ciência (FIOCRUZ, 2017).

O INPA tem por finalidade desenvolver e implementar pesquisas no âmbito Biodiversidade; Dinâmica Ambiental; Sociedade Ambiente e Saúde; Tecnologia e Inovação (INPA, 2017).

7. Microorganismos produtores de proteases na Amazônia

Os micro-organismos podem ser considerados uma fonte atrativa na produção de protease pela possibilidade de cultivo em processos fermentativos de forma a serem produzidos em um tempo reduzido e em grandes volumes. Proteases oriundas de micro-organismos têm uma validade mais



longa e, quando armazenadas em condições adequadas, não sofrem perdas significativas da atividade (YOUSIF; MCMAHON; SHAMMET, 1996; YU e CHOU, 2005 NEVES, 2014).

Nesse sentido, diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando bactérias, fungos e leveduras. Os resultados destes trabalhos proporcionaram dados para a construção do presente artigo.

7.1 Proteases oriundas de Cogumelos

Os cogumelos são macrofungos que são ricos em proteínas, fibras, vitaminas e baixo teor de lipídeos, além disso, apresentam aroma, textura agradável e podem ser aplicados como alternativa para complementar a alimentação humana (MACHADO, 2014).

Muitas espécies são fontes de compostos bioativos com propriedades medicinais, antimicrobiana, antioxidante e

síntese de enzimas secretadas durante a degradação do substrato (SILVA, 2015).

No Brasil, os cogumelos são cultivados tradicionalmente em bagaço de cana-de-açúcar, porém em virtude da escassez eminente desse resíduo são utilizados diversos resíduos agroindustriais como o algodão, palha de soja, sabugo de milho, casca de cupuaçu, farelo de arroz entre outros (FONSECA, 2013; MACHADO, 2014).

O uso de cogumelos em processos fermentativos vem ganhando espaço por necessitarem de níveis reduzidos de nutrientes para crescimento, fácil adaptação em meios naturais ou sintéticos e facilidades nas técnicas de cultivo (ORSINE et al., 2012; MANZUR et al., 2014).

A Tabela 1 mostra alguns trabalhos que buscaram produzir proteases a partir de cogumelos na região Amazônica.

Tabela 1 – Cogumelos produtores de proteases na região Amazônica, aplicação do estudo, fermentação empregada e substratos utilizados (continuação).

Cogumelos	Tipo de Fermentação	Enzima	Aplicação	Substratos	Referência
<i>P. sanguineus</i> 12B, <i>Streptococcus</i> 22B e <i>C. guyanensis</i> 4BL <i>L. citrinus</i> DPUA 1535	FS	Protease	Potencial proteolítico	Gelatina, farelo de soja e concentrado de peixe	SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE (2008)
<i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720	FES	Protease	Potencial proteolítico Valor nutricional e qualidade microbiológica	Amido solúvel e gelatina	KIRSCH (2009)
<i>L. citrinus</i>	FS E FES	Protease alcalina	Produto de confeitaria	Casca de cupuaçu e farelo de arroz	FONSECA (2013)
<i>P. florida</i>	FS	Protease coagulante	Indústria de laticínios	Casca de cupuaçu e farelo de arroz	MACHADO et al. (2016)
<i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720	FS	Protease alcalina	Indústria de detergente	Casca de cupuaçu e farelo de arroz	NEVES (2014)
<i>L. citrinus</i> DPUA 1535 e <i>P. ostreatoroseus</i> DPUA 1720	FES	Cisteína e serina proteases	Potencial Proteolítico	Amido, gelatina e extrato de levedura	SILVA (2015)
				<i>Dioscorea trifida</i> , <i>Manihot esculenta</i> e <i>Dioscorea alata</i>	MACHADO et al. (2017)

Legenda: FS (Fermentação Submersa); FES (Fermentação em Estado Sólido).



Em um estudo de seleção de basidiomicetos da Amazônia, foi investigada a produção de proteases, sendo testados: a gelatina, o farelo de soja e concentrado de peixe a 0,5% como substratos indutores a 28 °C e 140 rpm. Observou-se que a espécie *Streptococcus* 22 B obteve a maior média de halo (18,01 mm), seguido de *Pycnoporus sanguineus* 12 B (17,15 mm) e *Cantharellus guyanensis* 4BL (14,74 mm) referente a média dos três valores obtidos de cada substrato (SOUZA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2008).

KIRSCH (2009) estudou a produção de proteases através da fermentação submersa utilizando planejamento fatorial completo 2⁵ com 3 pontos centrais, tendo obtido um valor máximo de 32,2 U/mL em pH 7,0, 25°C, 5 dias de incubação em um meio formulado com amido solúvel (0,5% p/v) e gelatina (0,2% p/v) U/mL.

FONSECA (2013) buscou avaliar o crescimento micelial, a produção e caracterização parcial de proteases extracelulares de uma espécie de cogumelos *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 em diferentes resíduos agroindustriais amazônicos.

Foi observado que utilizando a casca de cupuaçu e farelo de arroz houve um crescimento micelial satisfatório com atividade proteolítica de 7,89 U/mL em pH 6,0 e 40°C, obtendo-se basidiomas com alto teor de fibras e proteínas, aminoácidos essenciais e não essenciais sendo aplicado como um alimento saudável e nutritivo (FONSECA, 2013).

NEVES (2014) também investigou a atividade coagulante da protease produzida no extrato bruto dos basidiomas de *P. florida* DPUA 1534 em meio formulado a base de casca de cupuaçu e 20% de farelo de arroz, obtendo-se 67,68 de atividade coagulante em pH 7,0 a 40°C. A protease foi inibida pelo composto Pepstatin A, sugerindo a presença de protease aspártica, indicando a possibilidade de aplicação na indústria de laticínios.

MACHADO et al. (2016) avaliou o rendimento e a qualidade nutricional de *Lentinus citrinus* cultivado em duas misturas

de agrosresíduos (casca de cupuaçu e farelo de arroz) disponíveis na Amazônia com finalidade de desenvolver um produto de confeitaria à base de crueira. Foi possível obter proteases com atividade ótima em pH 7,0 a 50°C e 9,0 a 30°C (470 U/mL e 453 U/mL, respectivamente).

SILVA (2015) verificou a produção de protease por quatro cogumelos (*Auricularia mixotricha* DPUA 1695, *Ganoderma lucidum* DPUA 1694, *Lentinus citrinus* DPUA 1693 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720) de podridão branca para selecionar uma espécie com características apropriadas para aplicação em formulações de detergentes. Observou-se que dentre as espécies estudadas, *P. ostreatoroseus* expressou maior atividade proteolítica (75,11 U/mL ± 0,77) a 30°C, 150 rpm em 72 horas e pH 7,0 e 9,0.

MACHADO et al. (2017) produziram e caracterizaram proteases a partir da biomassa micelial do cultivo de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1720 utilizando como substrato *Dioscorea trifida* (cará-roxo), *Manihot esculenta* (macaxeira) e *Dioscorea alata* (inhame-roxo) suplementado com farelo de arroz ou resíduo de farinha de mandioca em diferentes proporções. Os maiores resultados de atividade proteolítica foi determinado para o extrato bruto de *P. ostreatoroseus* crescido em *D. alata* sem suplementação (142,22 U/mL) em pH 7,0 e 40°C.

7.2 Proteases oriundas de Fungos filamentosos

Os fungos filamentosos microscópicos são predominantemente pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução assexuada. Sua estrutura morfológica fundamental é a hifa que pode ser uni ou multinucleada, septada ou cenocítica, sendo o seu conjunto constituído de micélio (ROCHA, 2010).

São capazes de produzir um grande número de metabólitos, sendo alguns de interesse industrial como álcoois, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos,



substâncias antibióticas e enzimas (CARVALHO, 1999 apud ROCHA, 2010).

Dentre os fungos filamentosos, diversos representantes do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* são classificados como GRAS (Geralmente Reconhecidos Como Seguros) devido à sua baixa toxicidade. Além disso, são produtores de uma gama de substâncias bioativas e podem ser utilizados para produção de enzimas hidrolíticas como as proteases (FERNANDES, 2009; VARGA et al., 2007).

A otimização do processo de fermentação em estado sólido foi estudado por CASTRO et al. (2014) para a produção simultânea de endoamilases, exoamilases, celulases, xilanases e proteases por *Aspergillus awamori* sob fermentação em estado sólido utilizando torta de babaçu como substrato, sendo alcançadas 197, 106, 20, 835 e 57 U_g⁻¹, respectivamente.

Em um estudo sobre isolamento e testes enzimáticos de fungos da região amazônica foi avaliado a presença de proteases com o intuito de conhecer suas propriedades para aplicação no controle biológico de insetos (CONCEIÇÃO, OLIVEIRA, 2017).

Pedaços de besouros foram colocados em amostras de solos, permitindo o desenvolvimento de fungos os quais foram inoculados a 25 °C durante 5 dias para detecção de proteases, observando a formação de halos enzimáticos em meio agar-gelatina-leite, sendo observado a houve formação de halo para alguns microorganismos indeterminados e para o *Fusarium* sp. com diâmetro de 90 mm (CONCEIÇÃO, OLIVEIRA, 2017).

TAVARES et al. (2012) isolou e identificou fungos da estrutura foliar sadia de *Morinda citrifolia* para verificação de enzimas e caracterização de proteases de *Aspergillus* e *Penicillium* para aplicação industrial.

O extrato bruto foi cultivado em meio MGYP (malte, glicose, extrato de levedura e peptona) pelo método de *cup plate* a 37°C por 18 horas. Em média a atividade das proteases dos isolados de *Aspergillus* variou de 1,36 U/mL a 3,38

U/mL e para *Penicillium* os valores foram superiores (10,82 U/mL) (TAVARES et al., 2012).

Com relação ao pH, a atividade máxima de proteases foi determinada na faixa de 6,0 (25°C), 8,0 (50°C) e 9,0 (60°C) para o gênero *Aspergillus* e pH 9,0 a 60°C para *Penicillium*, indicando um potencial para aplicação na indústria de detergentes e alimentos (TAVARES et al., 2012).

Foram testados 20 fungos filamentosos da biblioteca microbiana do Laboratório de Microbiologia e Fermentação do CAM da UFAM, sendo avaliados qualitativamente quanto à capacidade de produção de proteases. Os índices enzimáticos variaram de 0,1 a 0,7, sendo os isolados F1, F7 e F26 os que mais se destacaram. Foi escolhido o fungo F7 para análise quantitativa de atividade proteolítica utilizando resíduo de castanha, obtendo-se um valor de 51,43 ± 1,15 U/mL (SILVA; PAIVA; NOGUEIRA, 2010).

A Tabela 2 mostra o resumo dos trabalhos que buscaram produzir proteases a partir de fungos na região Amazônica.

7.3 Proteases oriundas de leveduras

As leveduras são distribuídas mundialmente e possuem metabolismo diversificado, proporcionando a utilização de uma variedade de nutrientes em condições ambientais distintas.

Alguns trabalhos selecionados buscaram selecionar uma variedade de leveduras isoladas, a partir de diferentes substratos da Região Amazônica. Verificase que, predominantemente, as cepas responsáveis pela produção de proteases foram os gêneros *Candida*, *Pichia* e *Debaryomyces* (BRAGA et al, 1998; BUZZINI; MARTINI, 2002; NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006).

SIQUEIRA (2012) analisou 50 amostras de leveduras isoladas de diferentes substratos (pele, tecido de peixe, unha, castanha e cupuaçu), provenientes da coleção de cultura DPUA. A atividade proteolítica qualitativa foi realizada para cada amostra, sendo a espécie *Trichosporon pullulans* selecionada com maior atividade



proteolítica nos testes qualitativos (halo = 27 mm) e quantitativos (420 U/mL) tendo maior estabilidade em pH 8,0 e 37°C; *T. pullulans* degradou colágeno, em meio

sólido, produzindo halos translúcidos, indicando um grande potencial para aplicação biotecnológica.

Tabela 2- Fungos filamentosos produtores de proteases na região Amazônica, aplicação do estudo, fermentação empregada e substratos utilizados.

Fungos	Enzimas	Tipo de Fermentação	Propriedades	Substratos	Referência
<i>A. awamori</i> IOC-3914	Protease	FS	Potencial proteolítico	Bolo de babaçu	CASTRO; CASTILHO; FREIRE (2014)
<i>Aspergillus</i> sp. e <i>Fusarium</i> sp.	Protease	FES	Potencial para uso agrônômico e florestal	Pedaços de besouros	CONCEIÇÃO e OLIVEIRA (2017)
<i>Aspergillus</i> sp. e <i>Penicillium</i> sp.	Protease alcalina e neutra	FS	Potencial para formulação de detergentes e alimentos	Extrato (MGYP- malte, glicose, extrato de levedura e peptona)	TAVARES <i>et al.</i> (2012)
Fungos filamentosos	Protease	FES	Potencial proteolítico	Resíduo de castanha	SILVA; PAIVA; NOGUEIRA (2010)

7.4 Proteases oriundas de bactérias

Estudos de microorganismos queratinolíticos têm sido principalmente relatados para aplicação biotecnológica. BACH *et al.*, (2011) testaram bactérias proteolíticas para a degradação de farinha de pena, tendo o *Bacillus* sp como papel importante para reciclagem de queratina na natureza.

Em um estudo da bioconversão da bactéria amazônica *Bacillus* sp. P45 foi possível produzir proteases queratinolíticas avaliando vários tipos de substratos como o farelo de penas, caseína, gelatina e soro de queijo. A protease bruta poderia produzir proteínas hidrolisadas com valor comercial para a utilização em rações animais e fertilizantes (DAROIT; CORRÊA; BRANDELLI, 2010).

GIONGO e colaboradores (2007) isolaram três espécies de *Bacillus* da bacia amazônica, P6, P7 e P11, sendo observadas as similaridades com o *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* e *B. velesensis*, respectivamente. As enzimas apresentaram atividade proteolítica máxima em pH 9,0 e foram aplicadas em estudos depilatórios os

quais se mostraram eficientes na remoção de pelos bovinos.

A aplicação das proteases colagenolíticas possui papel fundamental na área médica e na atividade industrial, LIMA (2013) propôs selecionar várias amostras de isolados de *Bacillus* sp. do solo para determinação da atividade de protease colagenolítica.

Foi aplicado dois sucessivos planejamentos fatoriais completos 2³ com quatro repetições no ponto central para análise das faixas de pH, temperatura e concentração do substrato (LIMA, 2013).

Oito amostras foram reativadas, duas apresentaram atividade de protease colagenolítica, sendo a máxima atividade para o *Bacillus* sp. de 86,27 U/mL com atividade específica de 145, 18 U/mg em pH 9,0 a 37°C com 1,5% (p/v) de concentração de substrato. Para o *B. stearothermophilus* foi de 79,38 U/mL e 136,92 U/mg em pH 7,2 a 25°C com 1% de substrato (LIMA, 2013).

SANTOS, CRUZ FILHO e TEIXEIRA (2016) isolaram microorganismos de amostras de solo amazônico com petróleo para selecionar espécies produtoras de proteases com potencial fibrinolítico. Das 30 colônias



isoladas, o *Bacillus* sp B28 expressou a máxima atividade proteolítica (7,07 U/mL) a 45°C e pH 8,4 e somente o *Bacillus* sp. B16 demonstrou atividade fibrinolítica.

A Tabela 3 mostra alguns trabalhos que buscaram produzir proteases a partir de bactérias na região Amazônica.

Tabela 3 – Bactérias produtores de proteases na região Amazônica, aplicação do estudo, fermentação empregada e substratos utilizados.

Bactérias	Enzimas	Tipo de fermentação	Aplicação	Substrato	Referência
<i>Bacillus</i> sp.	Protease queratinolítica	FS	Reciclagem de queratina na natureza	Farinha de pena	BACH et al. (2011)
<i>Bacillus</i> sp.	Protease queratinolítica	FS	Rações animais e fertilizantes	Farelo de pena, caseína, gelatina e soro de queijo	DAROIT; CORREA; BRANDELLI (2010)
<i>B. amyloliquefacien</i> , <i>B. subtilis</i> e <i>B. velesensis</i>	Protease	FS	Remoção de pelos bovinos	Albumina, caseína e gelatina	GIONGO et al. (2007)
<i>Bacillus</i> sp. e <i>B. stearothermophilos</i>	Protease colagenolítica	FS	Potencial proteolítico	Gelatina	LIMA (2013)
<i>Bacillus</i> sp. B28 e <i>Bacillus</i> sp. B16	Protease fibrinolítica	FS	Potencial fibrinolítico	Gelatina	SANTOS; CRUZ FILHO; TEIXEIRA (2016).

Legenda: FS (Fermentação Submersa); FES (Fermentação em Estado Sólido).

8. Considerações finais

Apesar de pouco explorada, a região amazônica dispõe de uma riqueza incalculável em biodiversidade macro e microbiológica e constitui uma fonte de valor altíssimo para inovação em biotecnologia, sendo assim se torna importante o estudo dos microorganismos que produzam eficientemente proteases de interesse industrial a partir de processos fermentativos.

9. Agradecimentos

Aos meus orientadores e colegas do HUB pelo total apoio.

10. Referências

AISSAOUI, N.; ABIDI, F.; MAHAT, S.; MARZOUKI, N. Purification and biochemical characterization of a novel protease from *Penicillium digitatum* – Use in bioactive

peptides production. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 1-12, 2014;

AKAO, P. K. **Caracterização biofísica e estrutural da metaloproteínase não-hemorrágica do veneno de *Bothrops moojeni* e da endo- β -glicanase do *Bacillus subtilis***. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, 2011;

BACH, E. CANNAVAN, F. S. DUARTE, F. R. S.; TAFFAREL, J. A. S.; TSAI, S. M.; BRANDELLI. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. **International Biodegradation & Biodegradation**. v. 65, p. 102-107, 2011;

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of structural**



Biocienciologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B15-B33, 2019

Revista on-line [http://www.scientia-](http://www.scientia-amazonia.org)

[amazonia.org](http://www.scientia-amazonia.org)

ISSN:2238.1910

Biology, San Diego, v. 134, p. 95-102, 2001;

BARROS, K. V. G. **Sistema de duas fases aquosas NaPA/PEG aplicado na purificação de proteases produzida por fungos filamentosos**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Brasília, 2014.

BIONORTE. **Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal**. Disponível em: < <http://www.bionorte.org.br/bionorte/descricao-darede.htm> > Acesso em: dez, 2017.

BITTENCOURT, M. L. S. de A. **Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do cerrado brasileiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2014.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência Ltda. Rio de Janeiro, 2008.

BRAGA, A. A.; MORAIS, P. B.; LINARDI, V. R. Screening of Yeasts from Brazilian Amazon Rain Forest for Extracellular Proteinases Production. **Applied Microbiology**. v. 21, p. 353-359, 1998.

BRITO, A. R.. **Otimização da produção de enzimas celulolíticas por fermentação em estado sólido sobre a casca de arroz e a casca de amendoim**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Itapetinga, 2015.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast-like strains isolated from tropical environments. **Journal of Applied Microbiology**. v. 23, p. 1020-1025, 2002.

CAPRARA, C. S. C. **Processo de Obtenção e caracterização de proteases extracelulares expressas por *Penicillium restrictum***. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília – Faculdade de Ciências da Saúde, Brasília, 2015.

CASTRO, A. M. O.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D. M. G. Multivariate Optimization and

Supplementation Strategies for the Simultaneous Production of Amylases, Cellulases, Xylanases, and Proteases by *Aspergillus awamori* Under Solid-State Fermentation Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology – Springer**. v. 175, n. 3, 2014.

CONCEIÇÃO, B. S.; OLIVEIRA, L. A. **Coleta, isolamento e testes enzimáticos de fungos com potencial para controle biológico de insetos**. In: XV Jornada de Iniciação Científica do PIBIC; CNPq/FAPEAM/INPA. Disponível em: < <http://repositorio.inpa.gov.br/bitstream/123/6206/1/Beatriz%20Souza%20da%20Conceicao.pdf> > Acesso: dez, 2017.

COUTO R.S.; SANROMÁN M.A. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. **Biochemical Engineering Journal**, n.22,p.211-219, 2005.

CRUZ, C. B. N., **Seleção dos clones produtores de amilases e proteases presentes na biblioteca Metanogênica de Terra Preta de Índio**. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica). Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2010.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of feather meal by the Amazonian bacterium bacillus sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 65, p. 45-51, 2011.

DELLAMANO, M. **Estudos funcionais de inibidores de cisteíno peptidases da cana-de-açúcar e caracterização de uma cisteíno peptidase de *Sphenophorus Levis*, uma importante praga da cultura canavieira**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

DUARTE, S. M. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteíno proteases (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, São Carlos, 2008.



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B15-B33, 2019

Revista on-line [http://www.scientia-](http://www.scientia-amazonia.org)

[amazonia.org](http://www.scientia-amazonia.org)

ISSN:2238.1910

EMBRAPA. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**. Ed. 1. 2009.

ESPÓSITO, T. S. **Resíduo do processamento de peixes comerciais como fontes de proteases alcalinas e seu potencial uso biotecnológico**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. Final Report: **Collection of Information on Enzymes. European Commission**. Contract no. B4-3040/2000/278245/MAR/E2. Co-operation between the Federal Environment Agency Austria and Inter-University Research Center for Technology, Work and the Culture, Austria, 2002. Disponível em <<http://europa.eu.int/comm/environment/dansub/enzymerepcomplete.pdf>> Acesso em: dez, 2017.

FARO, A. R. **Estudos estruturais e funcionais da Xylellaína, um cisteíno protease da bactéria *Xylella fastidiosa***, 2008, 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do Potencial Enzimático de fungos filamentosos de diferentes fontes**. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos). Universidade Federal de Lavras – MG, Lavras, 2009.

FIOCRUZ. **Fundação Oswaldo Cruz: uma instituição a serviço da vida**. Disponível em: <<https://portal.fiocruz.br/pt-br/content/pesquisa-e-ensino>> Acesso, dez, 2017.

FONSECA, T. R. B. *Pleurotus ostreatoroseus* DPUA 1729: Avaliação do Crescimento, Produção de Basidioma e Determinação da Atividade Proteolítica Em Resíduos Agroindustriais. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas (UFAM) - Instituto de Ciências Biológicas, Manaus, 2013.

GAMBÔA, A. G. **Utilização do inibidor de papaína extraído de sementes de *Adenantha pavonina* L. na purificação de proteases cisteínicas**.

Dissertação (Mestrado em Biologia). Universidade Federal de Goiás – Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia, 2010.

GIONGO, J. L.; LUCAS, F. S.; CASARIN, F.; HEEB, P. BRANDELLI, A. Keratinolytic proteases of *Bacillus* species isolated from the Amazon basin showing remarkable deherairing activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 23, p. 375-382, 2007.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases por linhagens de *Bacillus sp.*** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2006.

GONG, W.; ZHU, X.; LIU, S.; TENG, M.; NIU, L. Crystal structures of acutolysin A, a three-disulfide hemorrhagic zinc metalloproteinase from the snake venom of *Agkistrodon acutus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 283, n. 3, p. 657-658, 1998.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15-32, 2002.

GUPTA, R.; RAMNANI, P. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 21-33, 2006.

HADDAR, A.; AGREBI, R.; BOUGATEF, A.; HMIDET, N.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Two detergent stable alkaline serine-proteases from *Bacillus mojavenis* A21: Purification, characterization and potencial application as a laundry detergent additive. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3366 – 3373, 2009.

HAMIN NETO, Y. A. A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***. Dissertação (Produtos Naturais e Sintéticos). Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

HANDEM, S. A. **Inibidores de proteinases Aspárticas com Actividade**



Biociencia

Antimicrobiana. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade de Coimbra - Faculdade de Ciências e Tecnologia, Coimbra, 2013.

HASAN, F.; SHAN, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

INMETRO. **Inmetro contribui para o desenvolvimento da bioindústria na Amazônia.** Disponível: <http://www.inmetro.gov.br/noticias/verNoticia.asp?seq_noticia=4031> Acesso: dez, 2017.

INPA. **Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas.** Disponível em: <<http://portal.inpa.gov.br/index.php/sobre-a-pesquisa>> Acesso em: dez, 2017.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 345-351, 2002.

KONDO, M. Y. **Caracterização do Mecanismo catalítico da SGP, enzima protótipo das glutâmico peptidases.** Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

LADEIRA, S. A. ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. 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. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LAMBERT, P. W.; MEERS, J. L. The production of Industrial Enzymes. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 300, n. 1100, p. 263-282, 1983.

LIMA, L. A. **Proteases com atividade colagenolíticas produzidas por *Bacillus* spp. de solo amazônico.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade do Estado do

Amazonas (UEA) – Escola de Ciências da Saúde, Manaus, 2013.

MACEDO, A. J.; SILVA, W. O. B.; GAVA, R.; DRIEMEIR, D.; HENRIQUES, J. A.P.; TERMIGNONI, C. Novel Keratinase from *Bacillus subtilis* S14 Exhibiting Remarkable Dehairing Capabilities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 1, p. 594-596, 2005.

MACHADO, A. R. G.; TEIXEIRA, M. F. S.; KIRSCH, L. S.; CAMPELP, M. C. L.; OLIVEIRA, I. M. A. Nutricional value and proteases of *Lentinus citrinus* produced by solid state fermentation of lignocellulosic waste from tropical region. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 621-727, 2016.

MACHADO, A. R. G.; MARTIM, A. R.; ALECRIM, M. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Production and characterization of proteases from edible mushrooms cultivated on amazonic tubers. **African Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 46, p. 2160-2166, 2017.

MANZUR, A. P. P.; SAPNA, K.; REKHA MOL, K. R.; BHAT, S. G.; CHANDRASEKARAN, M.; ELYAS, K. K. Trypsin Inhibitor from Edible Mushroom *Pleurotus floridanus* Active against Proteases of Microbial Origin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, p. 167-178, 2014.

MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Practical Fermentation Technology.** Oxford University Press. Oxford, 1990.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

NEVES, C. S. **Produção de proteases coagulantes por espécies de *Pleurotus* em resíduos vegetais da Amazônia.** Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B15-B33, 2019

Revista on-line [http://www.scientia-](http://www.scientia-amazonia.org)

[amazonia.org](http://www.scientia-amazonia.org)

ISSN:2238.1910

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para a produção de protease extracelular. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

NIRMAL, N. O.; SHANKAR, S.; LAXMAN, R. S. Fungal Proteases: An Overview. **International Journal of Biotechnology & Biosciences**, v.1, n. 1, p.1 – 40, 2011.

ORSINE, J. V. C; BRITO, L. M. B.; NOVAES, M. R. C. G.; Cogumelos comestíveis: uso, conservação, características nutricionais e Farmacológicas. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 4, n. 32, p.452-460, 2012.

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

PEREIRA, J. O.; SOUZA, A. Q.L.; SOUZA, A. D. L.; FRANÇA, S. C.; OLIVEIRA, L. A. Overview on Biodiversity, Chemistry, and Biotechnological Potencial of Microorganisms from the Brazilian Amazon. In: AZEVEDO, J. L.; QUECINE, M. C. **Diversity and Benefits of Microorganisms from the Tropics**. Springer Internacional Publishing AG, 2017.

PILON, F. M. **Clonagem e expressão de serino-proteases de *Anticarsia gemmatilis* e caracterização cinético-enzimática de tripsinas-like purificadas, produzidas por sua microbiota intestinal**. 131f, 2012. Tese (Doctor Scientiae). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2012.

RAI, S. K.; MUKHERJEE, A. K. Optimization of production of na oxidant and detergent-stable alkaline β -keratinase from *Brevibacillus* sp. Strain AS-S10-II: Application of enzyme in laundry detergent formulations and in leather industry. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, p. 47-56, 2011.

ROCHA, C. P. **Otimização da Produção de Enzimas por *Aspergillus niger* em Fermentação em Estado Sólido**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Químicos). Universidade

Federal de Urbelândia – Faculdade de Engenharia Química, Uberlândia, 2010.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 1-7, 2004.

SANTOS, J. G.; CRUZ FILHO, R. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; Produção e caracterização de proteases de bacilos da Amazônia com potencial fibronolítico. **Scientia Amazonia**. v. 5, n. 1, p. 15-21, 2016.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral peptidase production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2689-2694, 2005.

SILVA, E. T. **Estabilização de proteases para aplicação tecnológica**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais). Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, L. A. O.; PAIVA, F. C.; NOGUEIRA.V. **Resíduo de castanha (*Bertholletia excelsa*) como substrato na fermentação sólida para produção de proteases e β -glucosidade**. In: 2º Seminário da Região Nordeste sobre Resíduos Sólidos, 2010 Disponível em: < <http://www.redisa.net/doc/artSim2010/Outro%20Tema/Res%C3%ADduo%20de%20castanha%20como%20substrato%20na%20fermenta%C3%A7%C3%o%20s%C3%B3lida.pdf> > Acesso: dez, 2017.

SILVA, L. S. C. **Produção de proteases neutras de cogumelos para aplicação na indústria de detergente**. Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica). Universidade do Estado do Amazonas (UFAM) – Instituto de Ciências Biológicas, Manaus, 2015.

SILVA, R. R. **Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto, 2011.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-



Biotecnologia

Scientia Amazonia, v. 8, n.1, B15-B33, 2019

Revista on-line [http://www.scientia-](http://www.scientia-amazonia.org)

[amazonia.org](http://www.scientia-amazonia.org)

ISSN:2238.1910

state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

SINHA, S. SINHA, S. Studies on the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 1, 2009.

SIQUEIRA, A. A. D. Proteases de leveduras para aplicação médica. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2012.

SODERO, A. C. R.; SIMONE, S. G.; SILVA, F. P. Mecanismo catalítico de protonação do sítio ativo de aspartil proteases Pepsina-Símbios. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 128-137, 2009.

SOUZA, P. M. D. **Produção de protease por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Fermentação). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

STÖCKER, W.; BODE, W. Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincin. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 5, n. 3, p. 383-390, 1995.

TAVARES, A. C. D.; FONSECA, J. S.; FONSECA, T. R. B.; BARRONCAS, J. F.; SOUZA, R. A. T.; SILVA, T. A.; TEIXEIRA, M. F. S. Extracellular Enzymes of Anamorphic Fungi Isolated from *Morinda citrifolia* L. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2012.

THIS, R. C. S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* sp. Kr10**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TSURUOKA, N.; NAKAYAMA, T.; ASHIDA, M.; HEMMI, H.; NAKAO, M.; MINAKATA, H.; OYAMA, H.; ODA, K.; NISHIMO, T. Collagenolytic Serine-Carboxyl Proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* Strain NTAP-1: Purification, Characterization, Gene Cloning, and Heterologous Expression.

Applied and Environmental Microbiology, v. 69, p. 163 – 169, 2003.

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS. **Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais**. Disponível em: <<http://www.pos.uea.edu.br/biotecnologia/categoria.php?area=CNV>> Acesso em: dez, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS. **PPG-Biotec homenageia professores e técnicos em comemoração aos 15 anos do Programa**, 2017. Disponível em: <<http://portal.ufam.edu.br/2013-04-29-19-3705/arquivo-de-noticias/6386-ppg-biotec-homenageia-professores-e-tecnicos-em-comemoracao-aos-15-anos-do-programa>> Acesso: dez, 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS. **UFAM promove desenvolvimento regional através do Centro de Apoio Multidisciplinar**, 2015. Disponível em: <<http://www.ufam.edu.br/materias-especiais/4631ufampromove-desenvolvimento-regional-atravesdo-centro-de-apoio-multidisciplinar>> Acesso em: dez, 2017.

VEERAPANDIAN, B.; COOPER, J. B.; SALI, A.; BLUNDELL, T. L.; ROSATI, R. L.; DOMINY, B. W.; DAMON, D. B.; HOOVER, D. J. Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases. **Protein Science**, v. 1, n. 3, p. 322-328, 1992.

VISHWANATHA, K. S.; RAO, A.; SINGH, S. A. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 129-138, 2010.

YU, P.J.; CHOU, C. C. Factors affecting the growth and production of milk-clotting enzyme by *Amylomyces rouxii* in rice liquid medium. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, p. 283 – 288, 2005;

ZANPHORLIN, L. M.; CABRAL, H.; ARANTES, E.; ASSIS, D.; JULIANO, L.; JULIANO, M. A.; SILVA, R.; GOMES, E.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O. Purification and characterization of a new alkaline serine



Biotechnologia

protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. *Process Biochemistry*, v. 46, p. 2137-2143, 2011.

ZAMBARE, V. NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from

***Scientia Amazonia*, v. 8, n.1, B15-B33, 2019**

Revista on-line [http://www.scientia-](http://www.scientia-amazonia.org)

[amazonia.org](http://www.scientia-amazonia.org)

ISSN:2238.1910

Pseudomonas aeruginosa MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. ***New Biotechnology***, v. 28, n. 2, p. 173-181, 2011.