



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



***Lentinus citrinus* (Walley e Rammeloo) DPUA 1535:
CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

LARISSA DE SOUZA KIRSCH

Manaus, Amazonas

Julho 2009

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

***Lentinus citrinus* (Walley e Rammeloo) DPUA 1535:
CRESCIMENTO, PRODUÇÃO E EXTRAÇÃO DE PROTEASES POR
FERMENTAÇÃO SUBMERSA**

LARISSA DE SOUZA KIRSCH

ORIENTADORA: Dr^a MARIA FRANCISCA SIMAS TEIXEIRA

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre
em Diversidade Biológica, área de
concentração em Caracterização da
Diversidade Amazônica

Manaus, Amazonas

Julho 2009

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Siméia Ale Girão CRB11ª 284

K61len Kirsch, Larissa de Souza
Lentinus citrinus (Walleye e Rammeloo) DPUA 1535 : crescimento, produção e extração de proteases por fermentação submersa / Larissa de Souza Kirsch. – Manaus, AM : UFAM, 2009.
52 f. : il. color. ; 30 cm

Inclui referências.
Dissertação (Mestre em Diversidade Biológica). Universidade Federal do Amazonas. Orientadora: Prof. Dra. Maria Francisca Simas Teixeira.

1. Fermentação 2. Enzimas 3. Cogumelos 4. Bioquímica
I. Teixeira, Maria Francisca Simas II. Título

CDU (1997) : 577.152.34 (043.3)

Aos meus pais, Curt e Marta, meu irmão
Davi e meu marido Adriano, com todo o meu
amor.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo constante.

A Dr^a. Maria Francisca Simas Teixeira, excelente orientadora. Obrigada por compartilhar comigo suas experiências, seu tempo e por depositar sua confiança em mim.

Aos meus pais, Curt e Marta, pelo carinho e incentivo.

Ao meu marido Adriano, pelo apoio e compreensão demonstrados em todos os momentos.

Aos colegas de laboratório, Rosana, Teresa, Carol, Érika, Taciana, Thayanna, Ritinha, Mircela e Ana Júlia, pela força e apoio durante esse período.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), CNPq e a Capes, pela bolsa concedida.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de desenvolver este trabalho na Coleção de Culturas DPUA/UFAM, pelo apoio e suporte oferecidos.

A Dr^a. Tatiana Souza Porto e Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto, obrigada pela atenção e disponibilidade em ajudar nas análises estatísticas do trabalho.

RESUMO

Lentinus citrinus (Walleye e Rammeloo) DPUA 1535 da Coleção de Culturas DPUA/UFAM foi submetido a fermentação submersa para a produção de proteases. Um planejamento fatorial completo 2^5 com 3 pontos centrais foi elaborado para avaliar a influência de fontes nutricionais, pH do meio de cultivo, temperatura e tempo de incubação na produção de biomassa e de proteases em cultivo submerso. A extração das proteases do extrato bruto de maior atividade foi realizada pelo Sistema de Duas Fases Aquosas - SDFA - PEG-fosfato, utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 com 3 pontos centrais. Os resultados mostraram que a melhor condição para o crescimento e produção das proteases secretadas por *L. citrinus* foi determinada no meio formulado com amido solúvel 0,5% (p/v) e gelatina 0,2% (p/v), pH 7,0, a 25 °C, em 5 dias. Verificou-se que, nas condições de fermentação somente fonte de nitrogênio e temperatura influenciaram no crescimento de *L. citrinus*, enquanto na atividade proteolítica todas as variáveis foram estatisticamente significativas. No processo de extração, em todos os ensaios do sistema PEG-Fosfato, as proteases particionaram para a fase superior e as melhores condições de extração dessas enzimas foram obtidas com PEG 6000 17,5% (m/m) e Fosfato 25% (m/m).

Palavras-chave: *Lentinus citrinus*, proteases, fermentação submersa, planejamento fatorial

ABSTRACT

Lentinus citrinus (Walleyne e Rammeloo) DPUA 1535 from Culture Collections DPUA 1535/UFAM was analyzed as the production of proteases by submerged culture. A full factorial design 2^5 with three central points was established to evaluate the influence of nutrient sources, pH of the culture medium, temperature and incubation time, in the production of biomass and proteases. The extraction of proteases from culture broth with higher activity was prepared by aqueous two-phase systems, PEG/phosphate by using a full factorial design 2^3 with three central points. The results showed that the best condition for growth and proteases production was determined in medium formulated with soluble starch, gelatin, pH 7,0, 25 °C in 5 days. It was found, in culture conditions, that only nitrogen source and temperature were significant in growth of *L. citrinus*, while for proteases production all variables were statistically significant. In PEG-phosphate systems, in all runs, the proteases moved to top phase, as well as the best conditions for extraction of enzymes were with obtained with PEG 6000, 17,5% (w/w) and phosphate 25% (w/w).

Key-words: *Lentinus citrinus*, proteases, submerged culture, factorial design

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	07
1.1. Enzimas proteolíticas	07
1.2. Proteases de cogumelos	08
1.3. <i>Lentinus citrinus</i> (Walley e Rammeloo)	10
1.3.1. Origem do isolado	10
1.3.2. Principais pesquisas acerca de <i>L. citrinus</i>	10
1.4. Extração líquido-líquido de biomoléculas pelo Sistema de Duas Fases Aquosas	12
2. REFERÊNCIAS	14
3. OBJETIVOS	20
4. CAPÍTULO 1: Crescimento de <i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535 e produção de proteases por fermentação submersa	21
Resumo	21
Abstract	22
4.1. Introdução	22
4.2. Material e Métodos	23
4.3. Resultados e discussão	26
4.4. Conclusão	32
4.5. Agradecimentos	32
4.6. Referências	32
5. CAPÍTULO 2: Extração líquido-líquido de proteases de <i>Lentinus citrinus</i> DPUA 1535 utilizando sistema de duas fases aquosas	36
Resumo	36
Abstract	37
5.1. Introdução	37
5.2. Material e Métodos	38
5.3. Resultados e discussão	42
5.4. Conclusão	48
5.5. Agradecimentos	48
5.6. Referências	48
6. CONCLUSÃO GERAL	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas proteolíticas

As proteases somam cerca de 60% do total de biocatalisadores comercializados mundialmente, com utilização no processamento de alimentos e bebidas, amaciamento de carne, nas indústrias de papel, detergentes, têxteis e na formulação de medicamentos (Rao *et al.*, 1998; Van Beilen e Li, 2002; Kirk *et al.*, 2002; Thys *et al.*, 2008).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) tais enzimas são classificadas como hidrolases (subgrupo 4; grupo 3). Quanto à posição da ligação peptídica a ser clivada (Tabela 1) elas podem ser exopeptidases e endopeptidases ou proteinases. As exopeptidases clivam ligações peptídicas ao final da cadeia polipeptídica, enquanto as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas. Neste último grupo encontram-se as principais proteases de interesse industrial (Rao *et al.*, 1998; Vandeputte-Rutten e Gros, 2002).

Quanto ao grupo funcional presente no sítio ativo (Tabela 1) as endopeptidases podem ser classificadas em serino proteases, aspártico proteases ou endopeptidases, cisteína protease e metaloproteases (Rao *et al.*, 1998; Vandeputte-Rutten e Gros, 2002; Santos e Koblitz, 2008).

As proteases ácidas possuem pH ótimo de atividade entre 2-4 e são amplamente utilizadas nas indústrias de alimentos, enquanto as alcalinas em pH 9-11, nas indústrias químicas, de detergentes, alimentos e farmacêuticas. As neutras são importantes para as indústrias de alimento por apresentarem função específica na hidrólise ligações de aminoácidos hidrofóbicos em pH neutro, reduzindo o gosto

amargo nos alimentos, provocado pela hidrólise das proteínas (Crueger e Crueger, 1990; Sandhya *et al.*, 2005).

Tabela 1- Classificação das proteases quanto a clivagem da ligação peptídica

Modo de atuação	Sítio ativo da enzima	Aminoácidos removidos
Exopeptidases (EC 3.4.11-19)	Aminopeptidases (Extremidade N-terminal)	Aminopeptidases
		Aminodipeptidases
		Aminotripeptidases
Endopeptidases (EC 3.4.21-99)	Carboxipeptidases (Extremidade C-terminal)	Serinocarboxipeptidases
		Metalocarboxipeptidases
		Cisteinocarboxipeptidases
		Serinoproteases (EC 3.4.21)
	Asparticoproteases (EC 3.4.23)	
	Cisteinoproteases (EC 3.4.22)	
	Metaloproteases (EC 3.4.24)	

Fonte: Rao *et al.* (1998); Santos e Koblitz (2008)

1.2. Proteases de cogumelos

Dentre as espécies de cogumelos produtoras de proteases, apenas um número reduzido apresenta especificidade apropriada para exploração comercial, as quais são denominadas GRAS (*generally regarded as safe*), não tóxicas e nem patogênicas. Tais proteases, em geral, são extracelulares e diretamente secretadas no substrato pelo organismo produtor, característica que simplifica o processo de “downstream” da enzima (Gupta *et al.*, 2002; Germano *et al.*, 2003).

Nesse contexto, os cogumelos representam excelentes fontes naturais dessas enzimas, embora o conhecimento da atividade proteolítica esteja limitado a decomposição da matéria orgânica por espécies saprofíticas, micorrízicas e ao fator de virulência de certos patógenos (Sabotic *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, pesquisas estão direcionadas para a busca de espécies de cogumelos com atividade proteolítica oriundas de cultivo em meio sólido e de basidiomas, especialmente para fins medicinais (Tabela 2).

As proteases são comumente produzidas por fermentação em meio líquido ou fermentação em estado semi-sólido. No primeiro processo os nutrientes estão homogeneamente distribuídos no meio de cultivo, os parâmetros físico-químicos são mais facilmente controlados e a recuperação de enzimas extracelulares torna-se facilitada, uma vez que estas são excretadas para o meio líquido. (Sandhya *et al.*, 2005). Por sua vez, a fermentação em estado semi-sólido embora apresente simplicidade no meio de cultivo utilizado, baixo custo de produção e baixa probabilidade de contaminação pela reduzida quantidade de água, pode oferecer problemas na determinação de parâmetros como pH, aeração, temperatura, umidade e baixa homogeneidade do meio e, conseqüentemente na produção de biocompostos de interesse (Sandhya *et al.*, 2005).

Tabela 2- Cogumelos produtores de proteases e classificação quanto ao tipo da protease

Cogumelos	Proteases	Referências
<i>Amanita muscaria</i>	Aspártico protease	Nehls <i>et al.</i> , (2001)
<i>Armillaria mellea</i>	Metaloproteinase	Healy <i>et al.</i> , (1999)
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Metaloproteinase	McHenry <i>et al.</i> , (1996)
<i>Flammulina velutipes</i>	Metaloprotease	Shin e Choi, (1998b)
<i>Grifola frondosa</i>	Aspártico-protease	Suzuki <i>et al.</i> , (2005)
<i>Irpex lacteus</i>	Aspártico protease	Fujimoto <i>et al.</i> , (2004)
<i>Lentinus edodes</i>	Serinoprotease	Odani <i>et al.</i> , (1999)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Aspártico protease	Datta, (1992)
<i>Pleurotus eryngii</i>	Metaloprotease	Wang e Ng, (2001)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Serinoprotease/Metaloprotease	Dohmae <i>et al.</i> , (1995b) Faraco <i>et al.</i> , (2005)
<i>Schizophyllum commune</i>	Serinoprotease	Johnston <i>et al.</i> ,(2000)
<i>Serpula lacrymans</i>	Serinoprotease	Watkinson <i>et al.</i> ,(2001)
<i>Tricholoma saponaceum</i>	Metaloprotease	Kim e Kim, (2001)

1.3. *Lentinus citrinus* (Walley e Rammeloo)

De acordo com as citações de Putzke (2002), a classificação do gênero *Lentinus* sempre foi muito contestada, inclusive ao nível de família, contudo na literatura especializada está classificado conforme citado abaixo.

Reino: Fungi

Divisão: Basidiomycota

Classe: Agaricomycetes

Família: Lentinaceae

Gênero: *Lentinus*

Espécie: *L. citrinus* Walley e Rammeloo



Fonte: Castillo, 2007

Figura 2- *L. citrinus* cultivado em resíduo agroflorestal da Amazônia

1.3.1. Origem do isolado

L. citrinus URM 2672 foi inicialmente isolado no Campus da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e identificado pela micologista Dr^a Maria Auxiliadora Cavalcante. Posteriormente, incorporado no acervo da Micoteca URM da Rede Norte e Nordeste de coleções de culturas de microrganismos, (RENNEBRA), uma rede multi-institucional da qual fazem parte as Coleções de Culturas Micoteca URM/UFPE, UFPEDA/UFPE, DPUA/UFAM, CCMB/UEFS, LAPEM/UEFS, em 2005. A RENNEBRA proporcionou o intercâmbio de uma cepa de *L. citrinus* fornecido para estudo em nível de pós-graduação a Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA). Atendendo a legislação da RENNEBRA, a cultura desse cogumelo foi incorporada no acervo da Coleção de Culturas DPUA, sob o número *L. citrinus* DPUA 1535.

1.3.2. Principais pesquisas acerca de *L. citrinus*

Atualmente, a maioria dos estudos disponíveis na literatura sobre essa espécie tem sido desenvolvida pelo grupo de pesquisadores e estudantes da

Coleção de Culturas do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas (DPUA) em cooperação com outras instituições de pesquisa do país, tais como UNICAMP, USP, UFRPE, UFPE, UFRR e com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Com relação ao crescimento e produção de metabólitos secundários, Castillo *et al.*, (2007) em estudos preliminares verificaram que *L. citrinus* expressou maior crescimento micelial em relação as demais espécies de cogumelos em meio ágar batata dextrose (BDA) a 25° C em 30 dias. Os resultados também demonstraram que *L. citrinus* apresentou atividade fungicida e bactericida frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis*, respectivamente, durante 30 dias de crescimento.

Em outros experimentos realizados acerca do potencial proteolítico e fibrinolítico, Monteiro e Teixeira (2007) observaram que em meio sólido tendo como substrato gelatina a 1% (p/v) *L. citrinus* expressou um halo de 2,23 cm, enquanto que no teste quantitativo (azocaseína 1%) a atividade proteolítica foi de 5,83 U/mL. Nas análises fibrinolíticas, utilizando-se plasma de coelho comercial, verificou-se a lise *in vitro* do coágulo de fibrina.

Simas *et al.* (2007) verificaram que a atividade proteolítica de *L. citrinus* correspondeu a 4,41 U/mL obtida em biomassa *in natura* e 3,35 U/mL em biomassa desidratada. Já nos testes fibrinolíticos a lise *in vitro* do coágulo de fibrina foi observada em 16 e 15 minutos para a biomassa *in natura* e desidratada, respectivamente.

Quando *L. citrinus* foi testado para verificação do potencial proteolítico por fermentação em meio líquido verificou-se que em meio de cultivo formulado com

extrato de levedura, glicose e peptona 0,5 % (p/v) durante 72 horas *L. citrinus* expressou atividade enzimática máxima de 440 U/mL (Kirsch *et al.*, 2008).

1.4. Extração líquido-líquido de biomoléculas pelo Sistema de Duas Fases Aquosas

O desenvolvimento de técnicas de purificação de biomoléculas tornou-se um dos importantes pré-requisitos na maioria dos processos biotecnológicos. Os métodos tradicionais de purificação envolvem, muitas vezes, custos dispendiosos e passos laboriosos como diálise, cromatografia iônica, cromatografia de afinidade, contudo, há necessidade de se obter técnicas de biosseparação em larga escala, que sejam eficientes, economicamente viáveis e que proporcionem elevado grau de pureza e recuperação (Babu *et al.*, 2008; Porto *et al.*, 2005).

Uma das técnicas que se enquadra nessas características, a purificação pelo sistema de duas fases aquosas – SDFA - consiste na partição de biomoléculas entre duas ou mais fases imiscíveis (Porto *et al.*, 2008).

Os SDFA são geralmente formados por uma combinação de determinados polímeros hidrófilos ou polímeros e sais. Para se entender melhor o SDFA e o comportamento da formação de fases no sistema é necessário estabelecer diagramas de fases, conforme demonstrado na Figura 3.

A Figura 3 representa uma curva binodal ou curva de equilíbrio que divide a região superior em bifásica e a inferior em monofásica. As linhas de amarração ou “tie-lines” representam um sistema com mesma composição, embora com diferentes volumes das fases superior e inferior. Acima das concentrações críticas desses componentes há formação espontânea das fases (Mazzola *et al.*, 2008).

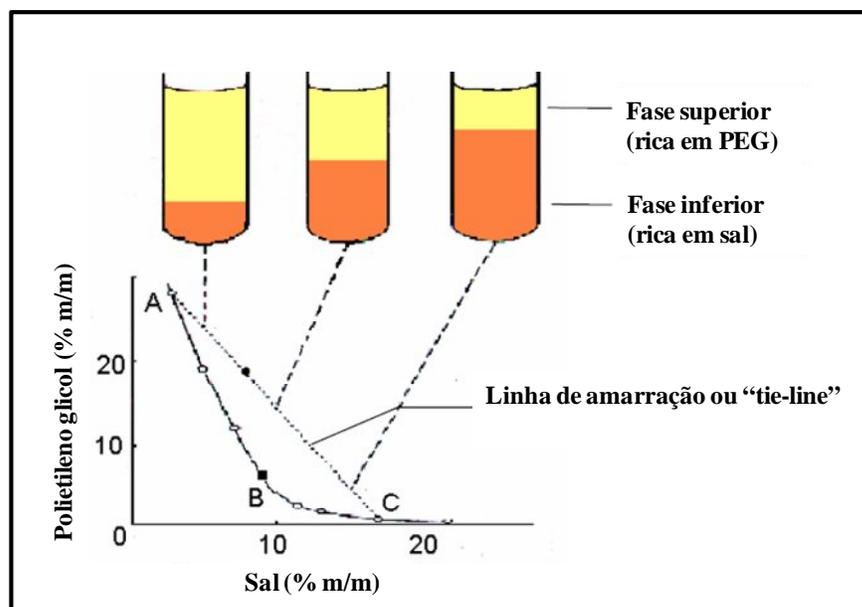


Figura 3. Diagrama de fases para um sistema PEG/sal

Uma particularidade importante no SDFA é seu elevado teor de água (65-90%), em massa, o que garante a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas em condições não desnaturantes (Porto *et al.*, 2005; Mazzola *et al.*, 2008).

Atualmente, um dos sistemas mais utilizados e estudados envolve um polímero não iônico, polietileno glicol (PEG) e sais de fosfato. Isso decorre do fato de apresentarem rápida separação de fases, reduzidos custos e elevada seletividade na separação de moléculas (Gavasane e Gaikar, 2003).

Alguns dos parâmetros que influenciam na formação dos SDFA e na partição de biomoléculas, incluem: (1) massa molar do polímero (quanto maior a massa molar do polímero maior a viscosidade e a dificuldade de partição das biomoléculas); (2) concentração do polímero (o sistema desloca-se em direção à região bifásica com o aumento da concentração do polímero); (3) concentração dos sais (interferem na partição de materiais eletricamente carregados); (4) pH (determina a hidrofobicidade e hidrofiliabilidade da molécula) (Mazolla *et al.*, 2008).

2. REFERÊNCIAS

Babu, B.R.; Rastogi, N.K.; Raghavaro, K.S.M.S. 2008. Liquid-liquid extraction of bromelian and polyphenol oxidase using aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering and Processing*. 47:83-89.

Castillo, T.; Pereira, J.R.; Teixeira, M.F. 2007. Crescimento de espécies de *Lentinus* associado à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. In: VI SINAFERM 2007/ XVI SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. FESO661. Curitiba: UFPR.

Crueger, A.; Crueger, W. 1990. *Biotechnology textbook of industrial microbiology*. 2 ed. New York, 343 p.

Datta, A. 1992. Purification and characterization of a novel protease from solid substrate cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biology and Chemistry*, 267: 728-732.

Dohmae, N.; Hayashi, K.; Miki, K.; Tsumuraya, Y.; Hashimoto, Y. 1995b. Purification and characterization of intracellular proteinases in *Pleurotus ostreatus* fruiting bodies. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59: 2074-2080.

Faraco, V.; Palmieri, G.; Festa, G.; Monti, M.; Sannia, G.; Giardina, P. 2005. A new subfamily of fungal subtilases: structural and functional analysis of a *Pleurotus ostreatus* member. *Microbiology*, 151: 457-466.

Fujimoto, Z.; Fujii, Y.; Kaneko, S.; Kobayahi, H.; Mizuno, H. 2004. Crystal structure of aspartic proteinase from *Irpex lacteus* in complex with inhibitor pepstatin. *Journal of Molecular Biology*, 341: 1227-1235.

Gavasane, M.R.; Gaikar, V.G. 2003. Aqueous two-phase affinity partitioning of *Penicillium acylase* from *E. coli*, in presence of PEG-derivatives. *Enzyme and Microbial Technology*, 32: 665-675.

Germano, S.; Pandey, A. ; Osaku, C.A. ; Rocha, S.N. ; Soccol, C.R. 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by solid-state of fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2): 246-251.

Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 381-395.

Healy, V.; O'Connell, J.; McCarthy, T.V.; Doonan, S. 1999. The lysine-specific proteinase from *Armillaria mellea* is a member of a novel class of metalloendopeptidases located in Basidiomycetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262: 60-63.

Johnston,, J.M.; Ramos, E.R.; Bilbrey, R.E.; Gathman, A.C.; Lilly, W.W. 2000. Characterization of ScPrl, a small serine protease, from mycelia of *Schizophyllum commune*. *Mycological Research*, 104: 726-731.

Kim, J.S.; Kim, J.E.; Choi, B.S.; Park, S.E.; Sapkota, K.; Kim, S.; Lee, H.H.; Kim, C.S.; Park, Y.; Kim, M.K.; Kim, Y.S.; Kim, S.J. 2008. Purification and characterization of fibrinolytic metalloprotease from *Perenniporia fraxinea* mycelia. *Mycological Research*, 112: 990-998.

Kirk, O.; Borchert, T.V.; Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4): 345-351.

Kirsch, L.S.; Caldas, J.S.; Moreira, L.C.; Porto, A.L.F.; Teixeira, M.F.S. Produção de proteases por *Lentinus citrinus* Walley e Rammeloo. In: I Workshop Internacional em Biotecnologia/III Encontro Alfa-Valnatura/ III Jornada Científica do Lika, 2008, Recife. *Resumos*. Recife, xp.

Mazzola, P.G.; Lopes, A.M.; Hasmann, F.A.; Jozala, A.F.; Penna, T.C.; Magalhães, P.O.; Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa Jr, 2008. A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 143-157.

McHenry, J.Z.; Christeller, J.T.; Slade, E.A.; Laing, W.A. 1996. The major extracellular proteinases of the silverleaf fungus, *Chondrostereum purpureum*, are metalloproteinases. *Plant Pathology*, 45: 552-563.

Monteiro, J.A.F. Teixeira, M.F.S. 2007. Enzimas fibrinolíticas de fungos anamorfos e basidiomicetos para uso futuro na terapia trombolítica. XVI CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFAM, 2007, Manaus. *Resumos*. Manaus: UFAM.

Nehls, U.; Bock, A.; Hampp, R. 2001. Excretion of two proteases by the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *Plant, Cell and Environment*, 24: 741-747.

Odani, S. Tominaga, K.; Kondou, S.; Hori, H.; Koide, T.; Hara, S.; Isemura, M.; Tsunasawa, S. 1999. The inhibitory properties and primary structure of a novel serine proteinase inhibitor from the fruiting body of the basidiomycete, *Lentinus edodes*. *Europe Journal of Biochemistry*, 262: 915-923.

Porto, T.S ; Monteiro, T.I.R.; Moreira, K.A.; Lima-Filho, J.L.; Silva, M.P.C.; Porto, A.L.F.; Carneiro da Cunha, M.G. 2005. Liquid-liquid extraction of an extracelullar alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and micelles systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5): 655-659.

Porto, T.S ; Medeiros e Silva, G.M.; Porto, C.S.; Cavalcanti, M.T.H.; Neto, B.B.; Lima-Filho, J.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Pessoa, A.Jr. 2008. Liquid-liquid extraction of proteases from fermented broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, 47: 716-721

Putzke, J.2002. Os gêneros *Pleurotus* e *Lentinus* (Agaricales, Basidiomycota, Fungos) No Brasil-I: 1º Lista de espécies e chaves de identificação. *Caderno e Pesquisa Séries em Biologia*, v.14 (1): 67-75.

Rao, M.B; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 597-635.

Sabotic, J.; Treek, T.; Popovic, T.; Brzin, J. 2007. Basidiomycetes harbor a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128 (2): 297-307.

Sandhya, C.; Sumantha, A. ; Szakacs, G. ; Pandey, A. 2005. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. *Process Biochemistry*, 40 (8):2689-2694.

Santos, L. F.; Koblitz, M.G.B. 2008. Proteases. IN: Koblitz, M.G.B.K. (Coord.) *Bioquímica de alimentos: teoria e aplicações práticas*. Rio de Janeiro: Guanaraba Koogan, 233p.

Shin, H.H. Choi, H.S. 1998b. Purification and partial characterization of a metalloprotease in *Flammulina velutipes*. *Journal of Microbiology*, 36: 20-25.

Simas, L.; Castillo, T.; Machado, A.; Fernandes, O. 2007. Estudo preliminar do potencial fibrinolítico de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 *in natura* e desidratado. IN: 5º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICOLOGIA, 2007, Recife. *Resumos*. Recife, p. 221.

Suzuki, N.; Nishibori, N.; Oodaira, Y.; Kitamura, S.; Michigami, K.; Nagaka, K.; Tataru, Y.; Lee, B.R.; Ichishima, E. 2005. Grifolisin, a member of the sedolisin family produced by the fungus *Grifola frondosa*. *Phytochemistry*, 66: 983-990.

Thys, R.C.S.; Guzzon, S.O.; Cladera-Oliveira, F.; Brandelli, A. 2006. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41: 67-73.

Van Beilen, J.B.; Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*, 13 (4): 338-344.

Vandeputte-Rutten, L.; Gros, P. 2002. Novel proteases: common themes and surprising features. *Current Opinion in Structural Biology*, 12: 704-708.

Wang, H.; Ng, T.B. 2001. Pleureryn, a novel protease from fresh fruiting bodies of the edible mushroom *Pleurotus eryngii*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289: 750-755.

Watkinson, S.C.; Burton, K.S.; Wood, D.A. 2001. Characteristics of intracellular peptidase and proteinase activities from the mycelium of a cord-forming wood decay fungus, *Serpula lacrymans*. *Mycology Research*, 105: 698-704.

3. OBJETIVOS

Geral

Investigar o crescimento de *Lentinus citrinus* associado à produção de proteases sob diferentes fontes nutricionais por fermentação submersa e conhecer o comportamento das proteases pelo Sistema de Duas Fases Aquosas.

Específicos

- Estabelecer o padrão de crescimento de *L. citrinus* em meio líquido, sob diferentes condições nutricionais, pH e temperatura associado a produção de proteases;
- Verificar a potencialidade do Sistema de Duas Fases Aquosas em relação a extração das protease de *L. citrinus*.

4. **CAPÍTULO 1. Crescimento de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e produção de proteases por fermentação submersa**

Larissa de Souza Kirsch

Ana Carolina dos Santos Pinto

Tatiana Souza Porto

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Maria Francisca Simas Teixeira

O artigo será submetido para PROCESS BIOCHEMISTRY

RESUMO

Nesta pesquisa foi analisada a influência de condições de cultivo no crescimento e produção de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535. Para tanto, um planejamento fatorial completo 2⁵ foi proposto e os resultados mostraram que a melhor condição para o crescimento e produção de proteases foi obtida em meio de cultivo formulado com amido solúvel 0,5% (p/v), gelatina 0,2% (p/v), pH 7,0 a 25 °C em 5 dias. Verificou-se que ao nível de 95% de significância, nas condições de fermentação, somente as variáveis fonte de nitrogênio e temperatura influenciaram no crescimento de *L. citrinus*, enquanto na atividade proteolítica todas as variáveis, inclusive muitas de suas interações foram estatisticamente significativas.

Palavras-chave: *Lentinus citrinus*, proteases, fermentação submersa

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the culture conditions on growth and proteases production by *Lentinus citrinus* DPUA 1535. A 2⁵ full factorial design was proposed and the results showed that the best condition for growth and proteases production was obtained in medium formulated with soluble starch 0,5% (w/v), gelatin 0,2% (w/v), pH 7,0, 25 °C in 5 days. The results showed that at a significance level of 95%, in culture conditions, only the variables nitrogen source and temperature influenced on *L. citrinus* growth and for proteases production all variables, and some interactions were significant.

Keywords: *Lentinus citrinus*, proteases, submerged culture

4.1. Introdução

O conhecimento sobre proteases presentes em cogumelos está limitado as proteases envolvidas na utilização de nutrientes e aos fatores de virulência em espécies patogênicas. Face a essas funções, proteases de várias classes catalíticas têm sido identificadas a partir de micélio de *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Serpula lacrymans*, *Schizophyllum commune* (serina proteases); *Chondrostereum purpureum*, *Coprinus* sp. (metaloproteases); *P. chrysosporium*, *Hypsizygus marmoreus* *Amanita muscaria* e *Irpex lacteus* (aspártica proteases) (Sabotic *et al.*, 2007).

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas que têm aplicação em diferentes setores industriais, tais como detergentes, produtos alimentícios, fármacos, couro, seda e recuperação da prata de filme de raio X (Joo e

Chang, 2005; Laxman *et al.*, 2005; Falahatpishe *et al.*, 2007; Thys *et al.*, 2008). A associação entre a aplicabilidade dessas enzimas e seu elevado valor econômico tem estimulado a realização de pesquisas com a finalidade de identificação de proteases com novas propriedades (Gupta *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008).

Enzimas, a exemplo de proteases, são comumente produzidas por tecnologia fermentativas, fermentação submersa e/ou semi-sólida. Dentro desta tecnologia, um tópico importante para promover a produtividade e a identificar as condições físicas e químicas adequadas para o organismo alvo, são as técnicas de otimização (Beg *et al.*, 2003; Oskouie *et al.*, 2008; Reddy *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Inclusive, quando técnicas de otimização de bioprocessos são delineadas por planejamentos estatísticos, elas permitem avaliar os efeitos das variáveis envolvidas no processo, estimar os efeitos significativos e suas possibilidades de interações, além de exigir um número menor de experimentos (Neto *et al.* 2007).

Neste trabalho um planejamento fatorial de dois níveis foi utilizado para estudar o crescimento de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 e a produção de proteases em cultivo submerso.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. *L. citrinus* e preparação do inóculo

L. citrinus DPUA 1535 do acervo da Coleção de Culturas DPUA/UFAM (Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas) foi a espécie utilizada neste estudo. As culturas preservadas em óleo mineral foram reativadas em ágar Batata Dextrose com extrato de levedura 0,5% (p/v) - BDA, inclinado em tubos de ensaio (25mm x 150mm). As culturas foram mantidas a 25 °C, sem luminosidade por oito dias (Castillo *et al.*, 2007). Dessas culturas foram

retirados fragmentos e transferidos para a superfície de BDA, em placas de Petri (90 mm x 15 mm), mantendo-se os cultivos em condições similares da cultura estoque.

4.2.2. Fermentação submersa

Um planejamento fatorial 2^5 completo com 3 pontos centrais, totalizando 35 experimentos foi elaborado para verificar a influência das variáveis fontes de carbono e nitrogênio, pH inicial do meio de cultivo, temperatura e tempo de incubação no crescimento micelial e produção de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535. Os níveis das variáveis do planejamento são mostradas na Tabela 1 (Neto *et al.*, 2007).

A fermentação submersa foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultivo com a seguinte formulação (g/L): KH_2PO_4 (0,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5); fontes de nitrogênio: peptona (2,0), gelatina (2,0) ou sulfato de amônio (2,0); fonte de carbono: glicose (5,0), frutose (5,0) ou amido solúvel (5,0) e 0,1 mL de solução de sais minerais [5 mg de MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$] (Rollan, 2003; Gbolagade, 2006).

O pH dos meios de cultivo foi ajustado para 6,0, 6,5 e 7,0 pela adição adequada de NaOH 1M ou HCl 1M. Os meios de cultivo foram esterilizados a 121 °C, 1 atm por 15 minutos. Após o resfriamento, discos de cultura ($\varnothing=8$ mm) de *L. citrinus* DPUA 1535 (item 4.2.1.) foram inoculados nos frascos e incubados sob agitação constante de 150 rpm em agitador orbital (Certomat MO) por 5, 10 e 15 dias.

Tabela 1- Níveis das variáveis do planejamento experimental 2⁵.

Variáveis	Níveis das variáveis		
	(-1)	(0)	(+1)
Fonte de carbono	Frutose	Glicose	Amido
Fonte de nitrogênio	Sulfato de amônio	Peptona	Gelatina
pH	6,0	6,5	7,0
Temperatura (°C)	25	30	35
Tempo de cultivo (dias)	5	10	15

(-), (0) e (+) indicam os níveis dos fatores como inferior, central e superior, respectivamente.

4.2.3. Determinação do crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535

A biomassa obtida da fermentação submersa foi separada por filtração a vácuo em papel de filtro nº 40 com peso conhecido, lavado três vezes em água destilada, seguindo-se a desidratação a 70 °C para quantificação da biomassa (Dong e Yao, 2005). O sobrenadante foi novamente filtrado em membrana polietersulfônica (0,22 µm) para determinação da atividade proteolítica.

4.2.4. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada a 25 °C segundo Leighton *et al.*,(1973), modificado. Azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA), em solução tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2 foi utilizada como substrato. A mistura reacional foi composta pela adição de 150 µL de extrato enzimático e 250 µL de substrato e incubada por 1 hora em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% (p/v) e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 8.000 x g a 4 °C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora.

4.2.5. Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o software “Statistica 8,0” (Statsoft, Inc., 2008, USA).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Variáveis que influenciam no crescimento e produção de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535

Os resultados obtidos nos 35 ensaios do planejamento fatorial para a produção de biomassa e proteases de *L. citrinus* DPUA 1535 nos diferentes meios de cultivo e a avaliação da influência das variáveis fontes de carbono e nitrogênio, pH, temperatura e tempo de cultivo estão mostrados na Tabela 2 e Figura 1 e 2, respectivamente.

Os dados da Tabela 2 demonstraram que da totalidade de experimentos realizados, a produção de biomassa de *L. citrinus* DPUA 1535 apresentou variação de 1,57 mg/mL a 5,76 mg/mL (ensaios 14 e 8), valores mínimos e máximos, respectivamente.

A Figura 1 mostra os valores dos efeitos estimados relativos à produção de biomassa de *L. citrinus* DPUA 1535. No gráfico de Pareto as variáveis e interações entre as variáveis estão representadas por siglas e letras no eixo vertical. O comprimento da barra vertical é proporcional ao efeito padronizado e a linha vertical (vermelha) é usada para julgar quais os efeitos são estatisticamente significativos. Portanto, as barras que se estendem além dessa linha correspondem aos efeitos estatisticamente significativos com um nível de 95% de significância.

Em relação a esses dados, os fatores temperatura e fonte de nitrogênio, quando analisados separadamente foram estatisticamente significativos. Estas duas variáveis apresentaram efeito negativo e positivo, respectivamente, indicando que a 25 °C e a utilização da gelatina como fonte nutricional favoreceram o crescimento e o aumento da biomassa de *L. citrinus* DPUA 1535 em meio líquido.

A temperatura torna-se um parâmetro essencial no desenvolvimento dos fungos em geral, tanto que são classificados em psicrófilos, mesófilos e termófilos, isto é, crescem em baixa, média e alta temperatura, respectivamente. Contudo, a maioria dos fungos cresce na faixa de 10-35 °C, exigindo temperatura ótima para crescimento entre 20-30 °C (Deacon, 1997). Neste trabalho, *L. citrinus* DPUA 1535 expressou crescimento máximo (5,76 mg/mL de biomassa) a 25 °C, propriedade que o classifica como mesófilo. Considerando a temperatura de crescimento, estes resultados são similares aos de Castillo *et al.*, (2007), para o crescimento micelial radial em meio sólido, para a mesma espécie.

Quando se considerou o efeito estimado da interação das variáveis (Figura 1), durante o processo de fermentação, a interação entre a temperatura e o tempo de cultivo foi significativa e com efeito positivo no crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535, indicando estas duas variáveis não atuam isoladamente, tendo uma influência sobre o efeito da outra. Desta forma, associando a temperatura de 25 °C e 15 dias de cultivo obteve-se a melhor condição para o crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535.

Ainda com relação ao crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535 (Tabela 2), os baixos valores de biomassa (1,57 mg/mL e 1,8 mg/mL) determinados nos cultivos contendo sulfato de amônio, nas condições experimentais, revelaram que essa fonte inorgânica não favoreceu o crescimento do cogumelo e sim fontes orgânicas de

nitrogênio, como gelatina (4,09 mg/mL, 5,76 mg/mL). Dados da literatura demonstraram também que fontes de nitrogênio orgânicas estimularam o crescimento de *L. subnudus* em relação aos aminoácidos e compostos de nitrogênio inorgânicos testados (Gbolagade *et al.*, 2006).

Observou-se também que, quando o sulfato de amônio foi utilizado como fonte nutricional, ao término da fermentação o pH foi drasticamente reduzido (Tabela 2), tornando o ambiente muito ácido e provavelmente essa condição tenha contribuído para a inibição do crescimento do *L. citrinus* DPUA 1535. Deacon, (1997) descreve que embora o sulfato de amônio seja utilizado como fonte de nitrogênio por diversas espécies fúngicas, não é uma fonte adequada para o crescimento desses organismos. Esse autor afirma que a liberação de íons H⁺ oriundos desse substrato, no meio de cultivo, pode reduzir rapidamente o pH para 4 ou menos, inibindo o crescimento de muitas espécies.

Neste trabalho, a ótima condição para produção de biomassa de *L. citrinus* DPUA 1535 foi obtida com fonte de carbono (amido), fonte de nitrogênio (gelatina), pH (7,0), temperatura (25 °C) e 5 dias de cultivo (Tabela 2).

Em relação à atividade das proteases, durante o crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535 em diferentes condições físico-químicas, os resultados apresentados na Figura 2, mostraram que todas as variáveis quando analisadas separadamente influenciaram de forma significativa. Entre essas, gelatina como fonte de nitrogênio e o amido como fonte de carbono favoreceram as maiores atividades proteolíticas. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com os de Rao *et al.*, (2006) e Reddy *et al.*, (2008) , os quais observaram que fontes orgânicas mais complexas de carbono e nitrogênio constituem substratos mais adequados para produção de

proteases em relação a açúcares simples, como a glicose que pode induzir repressão catabólica quando em elevadas concentrações.

Chauhan e Gupta, (2004) afirmam que não existe um meio de cultivo definido para a produção de proteases de origem microbiana, pois cada microrganismo tem uma exigência físico-química e nutricional peculiar para excretar essas enzimas. Apesar da diferença nutricional inerente de cada grupo de microrganismo, as fontes nutricionais orgânicas são as mais comumente utilizadas para a produção de proteases. Nesse sentido, Lee *et al.*, (2004) cita que os cogumelos frequentemente exigem entre outras fontes orgânicas, o amido para crescimento em meio líquido.

Sabe-se também que a excreção de proteases está relacionada não somente com parâmetros nutricionais, tais como fontes de nitrogênio e carbono, mas também com o pH do meio de cultivo, velocidade de agitação, período de incubação dentre outros (Gupta, *et al.*, 2002; Lima *et al.*, 2009).

Neste trabalho, tratando-se da interação entre as variáveis analisadas (Figura 2), o efeito de maior significância na produção de proteases foi observado entre a fonte de nitrogênio e temperatura, cujo efeito foi negativo. Este resultado demonstrou que quando *L. citrinus* DPUA 1535 foi cultivado a 25 °C e, no meio formulado com gelatina como substrato indutor foram determinadas as maiores atividades de proteases (32,2 U/mL e 22,0 U/mL) (Tabela 3). No entanto, verificou-se que a condição de cultivo que favoreceu a máxima atividade de proteases (32,2 U/mL) por *L. citrinus* DPUA 1535 foi no meio adicionado de amido e gelatina, como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, a 25 °C, pH 7,0 (Tabela 3).

Tabela 2- Resultados do planejamento fatorial 2⁵ com 3 pontos centrais para produção de biomassa e proteases por fermentação em meio líquido

Ensaio	Fonte de carbono	Fonte de nitrogênio	pH	Temperatura (°C)	Tempo de cultivo (dias)	pH final do extrato	Biomassa (mg/mL)	Atividade proteásica (U/mL)
1	Frutose	Sulfato de amônio	6,0	25	5	3,8	2,34	2,0
2	Amido	Sulfato de amônio	6,0	25	5	3,7	4,24	2,3
3	Frutose	Gelatina	6,0	25	5	5,9	4,08	3,7
4	Amido	Gelatina	6,0	25	5	5,9	2,95	9,3
5	Frutose	Sulfato de amônio	7,0	25	5	3,9	3,10	1,0
6	Amido	Sulfato de amônio	7,0	25	5	3,3	3,09	4,0
7	Frutose	Gelatina	7,0	25	5	6,0	4,00	6,0
8	Amido	Gelatina	7,0	25	5	6,8	5,76	32,3
9	Frutose	Sulfato de amônio	6,0	35	5	5,6	2,24	4,0
10	Amido	Sulfato de amônio	6,0	35	5	5,6	2,83	2,3
11	Frutose	Gelatina	6,0	35	5	6,7	2,15	3,7
12	Amido	Gelatina	6,0	35	5	7,0	2,57	5,7
13	Frutose	Sulfato de amônio	7,0	35	5	6,1	1,80	4,3
14	Amido	Sulfato de amônio	7,0	35	5	6,2	1,57	6,3
15	Frutose	Gelatina	7,0	35	5	7,0	1,71	8,0
16	Amido	Gelatina	7,0	35	5	7,1	1,62	8,0
17	Frutose	Sulfato de amônio	6,0	25	15	3,8	2,78	2,0
18	Amido	Sulfato de amônio	6,0	25	15	3,7	2,58	8,3
19	Frutose	Gelatina	6,0	25	15	7,6	3,33	19,7
20	Amido	Gelatina	6,0	25	15	7,4	4,09	19,3
21	Frutose	Sulfato de amônio	7,0	25	15	3,7	3,15	0,7
22	Amido	Sulfato de amônio	7,0	25	15	3,7	3,16	4,3
23	Frutose	Gelatina	7,0	25	15	7,4	3,50	13,3
24	Amido	Gelatina	7,0	25	15	7,3	3,43	22,3
25	Frutose	Sulfato de amônio	6,0	35	15	5,6	2,30	3,7
26	Amido	Sulfato de amônio	6,0	35	15	5,7	2,17	4,0
27	Frutose	Gelatina	6,0	35	15	6,5	2,52	6,0
28	Amido	Gelatina	6,0	35	15	6,4	2,43	10,7
29	Frutose	Sulfato de amônio	7,0	35	15	5,9	2,56	7,7
30	Amido	Sulfato de amônio	7,0	35	15	6,0	2,38	14,3
31	Frutose	Gelatina	7,0	35	15	5,8	3,05	11,7
32	Amido	Gelatina	7,0	35	15	5,9	3,02	12,3
33	Glicose	Peptona	6,5	30	10	7,1	4,46	17,3
34	Glicose	Peptona	6,5	30	10	7,1	4,98	16,0
35	Glicose	Peptona	6,5	30	10	7,0	4,62	17,0

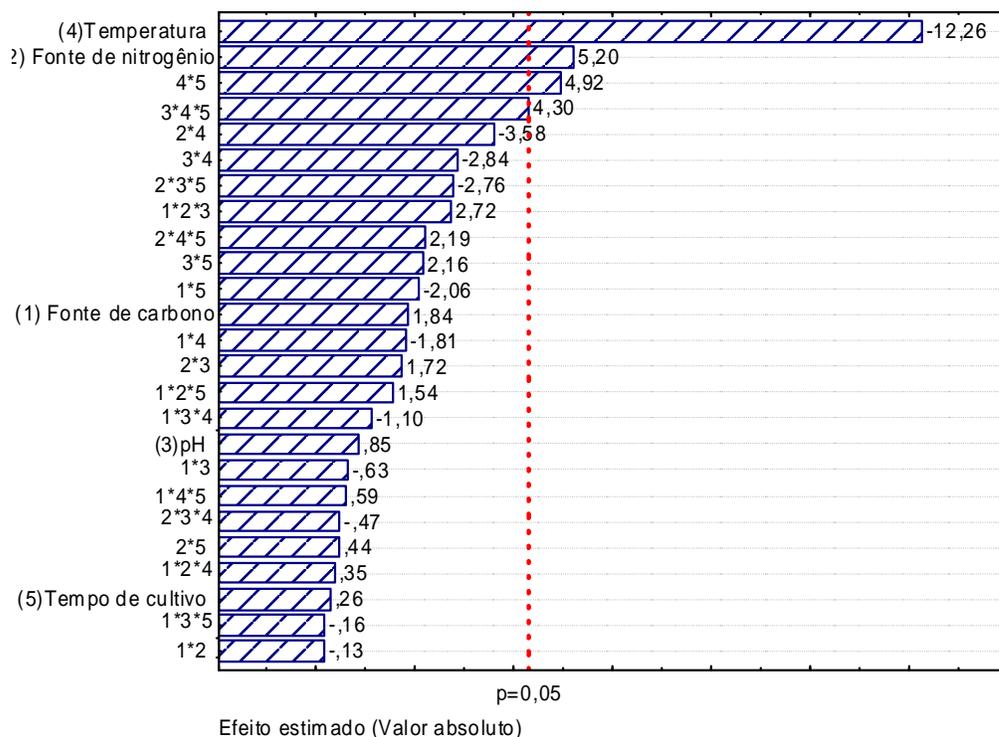


Figura 1. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis fonte de carbono (1), fonte de nitrogênio (2), pH (3), temperatura (4) e tempo de cultivo (5) no crescimento de *L. citrinus* DPUA 1535.

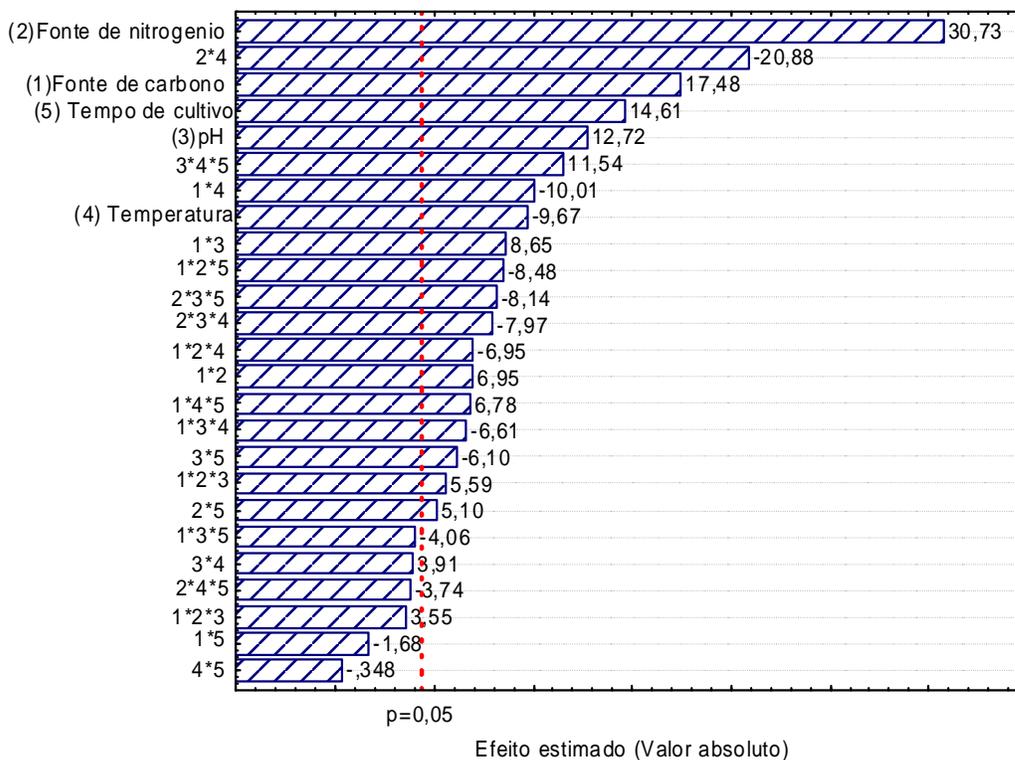


Figura 2. Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis fonte de carbono (1), fonte de nitrogênio (2), pH (3), temperatura (4) e tempo de cultivo (5) para a produção de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535.

4.4. CONCLUSÕES

Os resultados indicaram que *L. citrinus* DPUA 1535, cogumelo mesofílico cresce em meio com fontes orgânicas de nitrogênio e carbono, em pH neutro, condição que favoreceu a maior produção de proteases. O planejamento fatorial completo mostrou ser uma ferramenta promissora para o estudo do crescimento e produção de proteases.

4.5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedidos pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brasil), FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas, Manaus Brasil) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil).

4.6. REFERÊNCIAS

Beg, Q.K.; Sahai, B.; Gupta, R. 2003. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. *Process Biochemistry*, 39: 203-209.

Castillo, T.; Pereira, J.R.; Teixeira, M.F. 2007. Crescimento de espécies de *Lentinus* associado à produção de metabólitos com atividade antimicrobiana. In: VI SINAFERM 2007/ XVI SIMPOSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2007, Curitiba. *FESO661*. Curitiba: UFPR.

Chauhan, B.; Gupta, R. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production by *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39: 2115-2122.

- Deacon, J.W.1997. *Modern mycology*. Blackwell Science, Oxon, NY, 303pp.
- Dong, C.H.; Yao, Y.J. 2005. Nutritional requirements of mycelial growth of *Cordyceps sinensis* in submerged culture. *Journal of Applied Microbiology*, 99 (3): 483-492.
- Falahatpishhe, H.; Jalali, M.; Badami, N.; Mardani, N.; Khosravi-Darani, K. 2007. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (2): 110-113.
- Gbolagade, J.S. 2006. The effect of different nutrient sources on biomass production of *Lepiota procera* in submerged liquid cultures. *African Journal of Biotechnology*, 5 (12): 1246-1249.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. 2002. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 381-395.
- Gupta, A.; Babu J.; Abin, M.; Thomas, G. 2008. Biosynthesis and properties of an extracellular thermostable serine alkaline protease from *Virgibacillus pantothenicus*. *World Journal of Microbial Biotechnology*, (2008) 24:237–243.
- Joo, H.S.; Chang, C.S. 2005. Production of protease from a newly alkalophilic *Bacillus* sp I-312 grown on soybean meal: optimization and novel properties. *Process Biochemistry*, 40: 1263-1270.

Laxman, R.S.; Sonawane, A.T.; More, S.V.; Rao, B.S.; Rele, M.V.; Jogdad, V.V.; Deshpande, V.V.; Rao, M.B. 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40: 3152-3158.

Lee, B.C.; Bae, J.T.; Pyo, H.B.; Cho, T.B.; Kim, S. W.; Hwang, H.J. Yun, J.W. 2004. Submerged culture conditions for the production of mycelia biomass and exopolysaccharides by the edible basidiomycete *Grifola frondosa*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 369-376.

Leighton, T.J.; Doi, R.H.; Warren, R.A.; Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76: 103-122.

Lima, C.A.; Rodrigues, P.M.B.; Porto, T.S.; Viana, D.A.; Lima-Filho, J.L.; Porto, A.L.F.; Cunha, M.G.C. 2009. Production of a collagenase from *Candida albicans* URM 3622. *Biochemical Engineering Journal*, 43: 315-320.

Neto, B.B.; Scarminio, I.C.; Bruns, R.E. 2007. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2 ed. Campinas: Unicamp, 480p.

Oskouie, S.F.G.; Tabandeh, F.; Yakhchali, B.; Eftekhari, F. 2008. Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochemical Engineering Journal*, 39: 37-42.

Rao, Y.K.; Lu, S.C.; Liu, B.L.; Tzeng, Y.M. 2006. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassania* by optimization of cultivation process. *Biochemical Engineering Journal*, 28: 57-66.

Reddy, L.V.A.; Wee, Y.J.; Yun, J, S.; Ryu, H.W. 2008. Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett-Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99: 2242-2249.

Rollan, M.G. 2003. *Cultivo de setas y trufas*. 4ed. Madrid: Mundi Prensa, 2003. 239pp.

Sabotic, J.; Treek, T.; Popovic, T.; Brzin, J. 2007. Basidiomycetes harbor a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128 (2): 297-307.

Thys, R. C.S.; Guzzon, S.O.; Cladera-Oliveira, F.; Brandelli, A.2006. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41: 67-73.

Wang, S.L.; Yang, C.H.; Llan, T.W. Yen, Y.H. 2008. Optimization of conditions of protease production of *Chryseobacterium taeanense* TKU001. *Bioresource Technology*, 99: 3700-3707.

CAPÍTULO 2. Extração líquido-líquido de proteases de *Lentinus citrinus* DPUA 1535 utilizando sistema de duas fases aquosas

Larissa de Souza Kirsch

Ana Carolina dos Santos Pinto

Tatiana Souza Porto

Ana Lúcia Figueiredo Porto

Maria Francisca Simas Teixeira

O artigo será submetido para JOURNAL OF CHEMICAL TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY

RESUMO

Nesta pesquisa foi analisada a influência da massa molar do PEG, concentração do PEG e concentração de fosfato na extração de proteases de *L. citrinus* utilizando o SDFA. Um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado e demonstrou que as proteases particionaram para a fase superior do sistema em todos os ensaios, bem como indicou que a melhor condição de extração dessas enzimas foi obtida com massa molar do PEG 6000 (17,5%, m/m) e Concentração de fosfato (25%, m/m) com fator de purificação (1,1) e rendimento (151,1%).

Palavras-chave: *Lentinus citrinus*, proteases, sistema de duas fases aquosas, PEG-fosfato

ABSTRACT

The aim of this study was to analyze the influence of PEG molar mass and concentration and phosphate concentration to proteases extraction by *Lentinus citrinus* DPUA 1535 with the use of an aqueous two-phase system (ATPS). A 2⁵ full factorial design was performed and demonstrated that the proteases partition to top phase in all runs, and indicated that the best condition for enzymes extraction was obtained with PEG 6000 (17,5%, w/w) and phosphate concentration (25%, w/w), with factor purification (1,1) and activity yield (151,1%).

Keywords: *Lentinus citrinus*, proteases, aqueous two-phase system, PEG-phosphate

5.1. Introdução

Proteases ou peptidases são hidrolases responsáveis por cerca de 60% das enzimas comercializadas mundialmente, com aplicações nas indústrias de detergentes, têxteis, bebidas, amaciamento de couro e farmacêuticas (Joo e Chang, 2005; Laxman *et al.*, 2005; Falahatpishe *et al.*, 2007; Thys *et al.*, 2008). Estas enzimas são comumente encontradas em cogumelos, a exemplos de *Agaricus bisporus*, *Armillaria mellea*, *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus edodes*, *Lyophyllum cinerascens*, *Tricholoma saponaceum*, *Coprinus sp.*, *Inpex lacteus* e *Lentinus citrinus* (Sabotic *et al.*, 2007; Kirsch *et al.*, 2008).

A purificação de proteases comumente envolve a utilização de técnicas tradicionais, como as cromatográficas e precipitação com sulfato de amônio. Como alternativa a essas técnicas, o Sistema de Duas Fases Aquosas (SDFA) tem sido

empregado na separação e purificação de diversas biomoléculas, inclusive apresenta como vantagens, a redução dos custos de produção e operação em relação aos demais métodos (Chouyyok *et al.*, 2005; Chethana *et al.*, 2007; Babu *et al.*, 2008; Imelio *et al.*, 2008).

Os SDFA são geralmente formados por uma combinação de determinados polímeros hidrófilos ou polímeros e sais, onde acima das concentrações críticas desses componentes há formação espontânea de duas fases aquosas. Uma particularidade importante nesse sistema é seu elevado teor de água (65-90%), em massa, o que garante a manutenção das propriedades biológicas das biomoléculas em condições não desnaturantes (Gavazane e Gaikar, 2003; Mazzola *et al.*, 2008).

O uso de planejamentos experimentais é considerado uma importante ferramenta para o conhecimento dos principais fatores relacionados a extração de proteases, pois permite estimar as principais variáveis que interferem significativamente nos SDFA, indicam os efeitos de interação entre as variáveis, além de reduzir o número de experimentos necessários (Klomklao *et al.*, 2005; Porto *et al.*, 2008).

Nesta pesquisa um planejamento fatorial de dois níveis foi elaborado para estudar a extração de proteases de *L. citrinus* DPUA 1535 pelo Sistema de Duas Fases Aquosas PEG-fosfato.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1. Organismo, crescimento e produção enzimática

L. citrinus do acervo da Coleção de Culturas DPUA (Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas-UFAM) foi a espécie utilizada neste estudo. A partir das culturas reativadas em ágar Batata Dextrose com extrato

de levedura 0,5% (p/v) - BDA foram transferidos discos de cultura ($\varnothing=8$ mm) para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL de meio de cultivo com a seguinte formulação: KH_2PO_4 (0,05% p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05% p/v), gelatina (0,2% p/v), amido solúvel (0,5% p/v) e 0,1 mL de solução de sais minerais [5 mg de MnSO_4 , CuSO_4 , ZnSO_4 , $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$] (Rollan, 2003; Gbolagade, 2006). A fermentação submersa foi conduzida sob agitação constante de 150 rpm em agitador orbital (Certomat MO) por 5 dias. O extrato bruto foi filtrado em membrana polietersulfônica (0,22 μm) e o sobrenadante foi utilizado na determinação da atividade proteolítica.

5.2.2. Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada a 25 °C segundo Leighton *et al.*, (1973), modificado. Azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Luis, MO USA), em solução tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2 foi utilizada como substrato. A mistura reação foi composta pela adição de 150 μL de extrato enzimático e 250 μL de substrato e incubada por 1 hora em câmara escura. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético 10% (p/v) e, em seguida as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 8.000 x g a 4 °C. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,01 em uma hora.

5.2.3. Efeito do pH na atividade enzimática

O efeito do pH na atividade proteolítica do extrato bruto foi determinado, onde as amostras foram submetidas a diferentes faixas de pH, nos tampões Citrato-

Fosfato 0,2 M (pH 5-6), Tris-HCl 0,2M (7,2-8,0), e Carbonato-Bicarbonato 0,2M (9), incubadas por 1 hora a 25 °C e em seguida a atividade proteolítica foi determinada (item 5.2.2).

5.2.4. Preparação do Sistema de Duas Fases Aquosas

As proteases do extrato bruto foram submetidas ao Sistema de Duas Fases Aquosas- SDFA (Porto *et al.*, 2005). Os sistemas PEG-fosfato foram preparados, para uma massa final de 6g, a partir de soluções concentradas de PEG (50% m/m), fosfato de potássio (40% m/m) [fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4) e dibásico (K_2HPO_4)] e água deionizada e acondicionados em tubos graduados (15 mL) tipo Falcon. Em seguida, foram adicionados aos sistemas 500 μL de extrato bruto, homogeneizados em vórtex por 60 segundos e mantidos em temperatura ambiente para separação de fases. As duas fases (superior e inferior) foram separadas por decantação e coletadas separadamente para determinação da concentração protéica e da atividade proteolítica.

5.2.5. Planejamento experimental para extração das proteases pelo sistema de duas fases aquosas

A influência das variáveis concentração de PEG (C_{PEG}), concentração de fosfato (C_{FOS}), e massa molar do PEG (M_{PEG}) sobre o coeficiente de partição (K), fator de purificação (F_P) e rendimento (R) foi avaliada de acordo com planejamento experimental completo 2^3 com 3 repetições no ponto central, conforme demonstrado na Tabela 1 (Neto *et al.*, 2007).

Tabela 1. Níveis das variáveis do planejamento experimental 2³

Variáveis	Níveis das variáveis		
	(-1)	(0)	(+1)
M _{PEG}	550	4000	6000
C _{PEG} (%)	12,5	15,0	17,5
C _{FOS} (%)	15	20	25

(-), (0) e (+) indicam os níveis dos fatores como inferior, central e superior, respectivamente.

5.2.6. Determinação do coeficiente de partição, fator de purificação e rendimento

O coeficiente de partição foi calculado pela razão da atividade proteásica na fase superior (A_s) sobre a fase inferior (A_i).

$$K = \frac{A_s}{A_i}$$

O fator de purificação foi calculado pela razão entre a atividade específica na fase superior sobre a atividade específica do extrato bruto.

$$FP = \frac{A_s/C_t}{A_i/C_i}$$

Onde: A_s e A_i são atividade proteolítica na fase superior e do extrato bruto, respectivamente. C_t e C_i são concentração de proteínas totais na fase superior e do extrato bruto, respectivamente e expressas em mg/mL.

O conteúdo protéico foi determinado segundo metodologia descrita por Bradford (1976), utilizando-se o kit Doles e tendo como padrão a soro albumina-bovina.

O rendimento foi determinado pela taxa da atividade total na fase superior sobre a atividade do extrato bruto e expresso em porcentagem.

$$R = \left(\frac{A_p V_s}{A_i V_i} \right) \times 100$$

Onde: V_s e V_i são os volumes da fase superior e do extrato bruto, respectivamente.

5.2.7. Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados através de análise de variância (ANOVA) ao nível de 95% de significância. Os gráficos e análises estatísticas foram realizados utilizando-se o software “Statistica 8,0” (Statsoft, Inc., 2008, USA).

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Extração líquido-líquido de proteases de *L. citrinus*

Com a finalidade de obter as melhores condições de extração das proteases utilizando o sistema PEG-fosfato, inicialmente o extrato bruto foi submetido a determinação do pH ótimo de atividade proteolítica. Dessa forma, os resultados das análises mostrados na Figura 1 indicam que a enzima foi ativa na faixa de pH (5,0 – 9,0), contudo exibiu máxima atividade proteásica em pH 7,2. A partir desses resultados optou-se por manter o pH 7,0 nos experimentos com o sistema de duas fases aquosas.

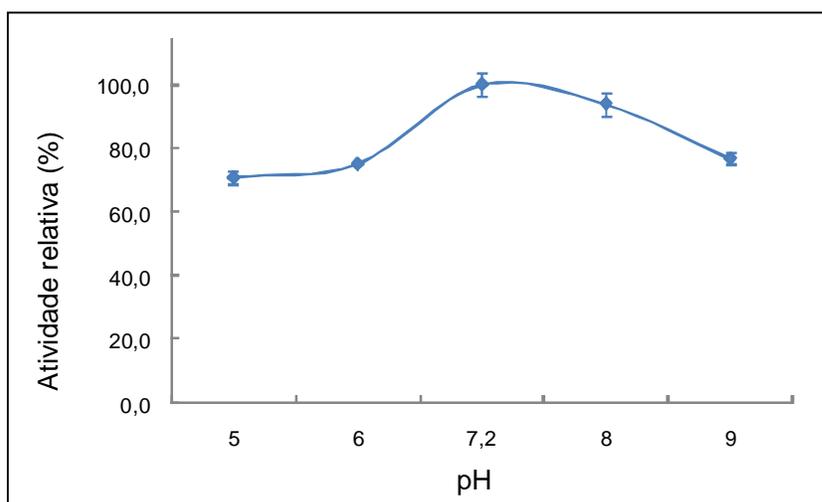


Figura 1 - Efeito do pH na atividade da protease de *L. citrinus* DPUA 1535. O desvio padrão dos valores analisados está indicado por barras

Os resultados obtidos nos 11 ensaios do planejamento fatorial 2^3 , bem como as variáveis resposta coeficiente de partição (K), fator de purificação (F_P) e rendimento (R) estão mostrados nas Tabelas 2 e 3.

Com relação ao coeficiente de partição (K) verificou-se que em todos os sistemas testados a protease particionou preferencialmente para a fase superior, rica em PEG (Tabela 2). Esses dados se assemelham aos de Nitsawang *et al.* (2006) e Nalinanon *et al.* (2009), os quais reportaram a migração de proteases para a fase superior ao processarem proteases de *Carica papaya* e *Thunnus alalunga*, pelo Sistema PEG-fosfato e PEG-sulfato de amônio, respectivamente.

Os dados obtidos neste trabalho em relação ao coeficiente de partição (Tabela 3) mostraram que apenas as variáveis C_{PEG} e C_{FOS} , individualmente, foram significativas, ambas apresentando efeitos positivos. Isto significa que o aumento da concentração de PEG e de sais de Fosfato favoreceu a transferência da protease para a fase superior, aumentando o coeficiente de partição. O maior valor de K (23,0) foi observado no ensaio 7 (Tabela 2), que corresponde a combinação dos fatores M_{PEG} (550 g/mol), C_{PEG} (17,5%) e C_{FOS} (25%).

Segundo Han e Lee (1997), os íons fosfato distribuem-se na fase inferior do sistema, pelo fato de apresentarem maior densidade, tornando assim, a fase inferior mais negativa, o contrário da fase superior, menos densa e rica em PEG. Portanto, a maioria das proteínas carregadas negativamente migra para a fase superior. À medida que a concentração de sais de fosfato aumenta, as proteínas com essas características particionam para a fase rica em PEG devido a força de repulsão dos ânions da fase inferior.

Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho relativo ao efeito do aumento da concentração de fosfato em relação ao coeficiente de partição foram

também encontrados por Babu *et al.* (2008). Esses autores reportaram que a substituição da concentração de fosfato de 14 % (m/m) para 20% (m/m) no sistema PEG/fosfato resultou no aumento do coeficiente de partição da bromelina de 5,7 para 17,3, respectivamente. Esse fenômeno pode ser explicado pelo efeito “salting out”, cujo aumento da concentração de sal reduz a solubilidade da biomolécula na fase inferior particionando-a para a fase superior.

Nesta pesquisa, os resultados referentes a M_{PEG} revelaram que esse parâmetro não foi significativo no coeficiente de partição. Em geral, tem sido observado que o aumento da massa molar do polímero favorece a partição das biomoléculas para a fase inferior (Porto *et al.*, 2005; Chethana *et al.*, 2007). A massa molar do polímero torna-se uma variável muito importante, uma vez que seu efeito é altamente dependente do peso molecular da biomolécula submetida a purificação. Normalmente, a partição de proteínas de baixo peso molecular é muito pouco influenciada pela variação da massa molar do polímero, o que já não ocorre com proteínas de alto peso molecular (Mazzola *et al.*, 2008).

Para a resposta fator de purificação nesse estudo foi verificada que todas as variáveis e a interação entre elas foram estatisticamente significativas. No entanto, analisando os efeitos individualmente, a C_{FOS} foi o de maior significância, ou seja, o aumento da concentração de sais de fosfato proporcionou um melhor fator de purificação.

A interação das três variáveis (M_{PEG} , C_{PEG} e C_{FOS}) foi significativa e positiva, indicando que o aumento concomitante da concentração de PEG e fosfato, bem como da massa molar do PEG favoreceram o fator de purificação da protease de *L. citrinus* DPUA 1535. Isto pode ser observado no sistema formado com M_{PEG} (6000

g/mol), C_{PEG} (17,5%) e C_{FOS} (25%), com fator de purificação ($F_p=1,1$), conforme indicado na Figura 2.

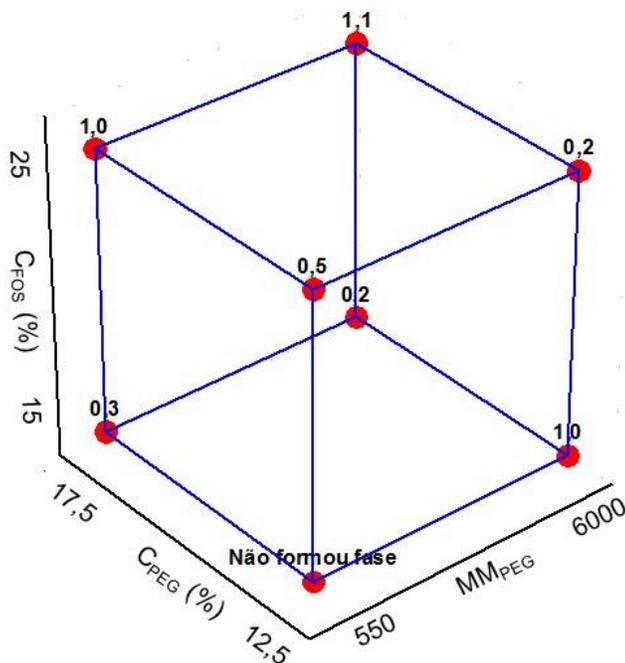


Figura 2- Gráfico cúbico dos valores de fator de purificação obtidos na Tabela 2.

Valores similares foram reportados para a extração da polifenol oxidase, utilizando Sistema PEG-fosfato, onde o fator de pureza ou purificação aumentou com a concentração de fosfato de potássio, embora houvesse um decréscimo na recuperação da atividade enzimática na fase superior do sistema. Isso pôde ser verificado quando Babu *et al.*, (2008) utilizaram PEG 4000 e substituíram a C_{PEG} de 14% (m/m) para 20 %, (m/m) onde o fator de purificação passou de 2,2 para 2,8, respectivamente.

Para a variável rendimento (%) observou-se que o efeito M_{PEG} foi o mais significativo (positivo), demonstrando que o aumento da M_{PEG} favorece a recuperação da protease. Conforme demonstrado na Figura 3, o melhor rendimento (151,1) foi obtido no ensaio 8, representado pela M_{PEG} 6000, C_{PEG} (17,5%) e C_{FOS} (25%). Vale ressaltar que nessa condição foram obtidos os maiores valores tanto para o fator de purificação (1,1) quanto para o rendimento (151,1 %).

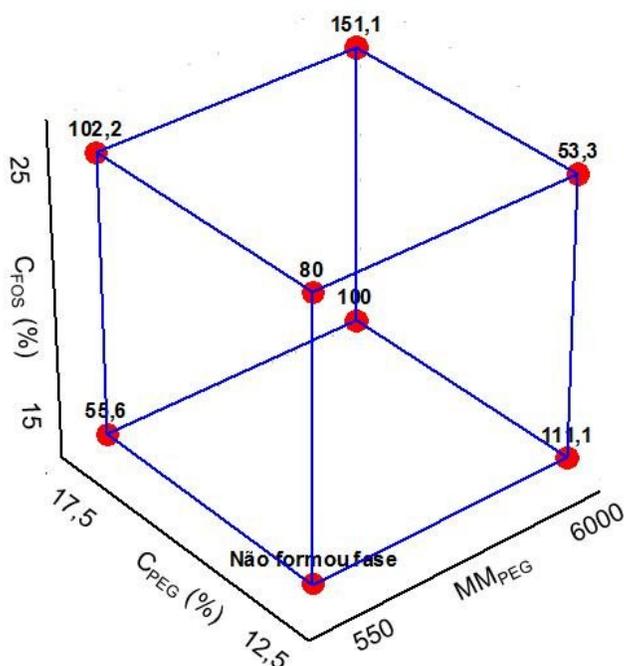


Figura 3- Gráfico cúbico dos valores de rendimento (%) obtidos na Tabela 2.

Os resultados deste trabalho diferem dos obtidos por Mayolo-Deloisa *et al.*, (2009) na extração de uma lacase de *Agaricus bisporus*. Esses autores reportaram que embora a recuperação da enzima tenha sido maior no sistema PEG-fosfato, pH 7,0, a utilização de PEG com massas molares menores favoreceu a recuperação em 80%.

Com os resultados deste trabalho verificou-se que com exceção de três ensaios, todos os valores de rendimento foram maiores que 100%. Estes resultados são considerados satisfatórios (151 %) quando comparados aos obtidos por Nalinanon *et al.*, (2009) na purificação de proteases de *Thunnus alalunga* pelo sistema PEG-sulfato de amônio, cujo rendimento foi de 85%.

Tabela 2- Resultados do planejamento fatorial 2³ da extração da protease de *L. citrinus* DPUA 1535.

Ensaio	M _{PEG}	C _{PEG} (%)	C _{FOS} (%)	K	F _p	R
1	550	12,5	15		Não formou fase	
2	6000	12,5	15	6,7	1,0	111,1
3	550	17,5	15	1,3	0,3	55,6
4	6000	17,5	15	7,5	0,2	100,0
5	550	12,5	25	4,0	0,5	80,0
6	6000	12,5	25	4,0	0,2	53,3
7	550	17,5	25	23,0	1,0	102,2
8	6000	17,5	25	17,0	1,1	151,1
9	4000	15,0	20	6,2	0,4	137,8
10	4000	15,0	20	7,8	0,5	137,8
11	4000	15,0	20	5,3	0,4	142,

M_{PEG}, - Massa Molar do PEG; C_{PEG} – Concentração do PEG; C_{FOS} – Concentração de fosfato; K- Coeficiente de partição; F_p - Fator de purificação na fase superior do sistema; R – Rendimento na fase superior do sistema.

Tabela 3- Efeito dos fatores analisados na extração da protease de *L. citrinus* DPUA 1535 pelo sistema PEG-fosfato.

Variáveis	Efeito estimado		
	K	F _p	R
(1)M _{PEG}	1,99 ± 0,85	5,10 ± 0,03 ⁺	24,49 ± 1,81 ⁺
(2)C _{PEG}	9,84 ± 0,85 ⁺	7,09 ± 0,03 ⁺	22,65 ± 1,81 ⁺
(3)C _{FOS}	9,40 ± 0,85 ⁺	11,00 ± 0,03 ⁺	16,53 ± 1,81 ⁺
1*2	-1,85 ± 0,85	-5,62 ± 0,03 ⁺	1,22 ± 1,81
1*3	-5,46 ± 0,85 ⁺	-8,05 ± 0,03 ⁺	-18,37 ± 1,81 ⁺
2*3	8,63 ± 0,85 ⁺	14,51 ± 0,03 ⁺	10,41 ± 1,81 ⁺
1*2*3	-1,61 ± 0,85	12,22 ± 0,03 ⁺	19,59 ± 1,81 ⁺

K- Coeficiente de partição; F_p - Fator de purificação na fase superior do sistema;

R – Rendimento na fase superior do sistema. ⁽⁺⁾ Efeitos estatisticamente significativos

5.4. CONCLUSÕES

A partir dos experimentos realizados pode-se concluir que o Sistema de duas fases aquosas PEG-fosfato não mostrou ser suficientemente efetivo na purificação total das proteases de *L. citrinus* DPUA 1535, embora seja uma considerada uma ferramenta simples, economicamente viável e promissora nas etapas iniciais de purificação enzimática.

5.5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio financeiro concedidos pela Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasília, Brasil), FAPEAM (Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas, Manaus Brasil) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Brasil).

5.6. REFERÊNCIAS

Babu, B.R.; Rastogi, N.K.; Raghavaro, K.S.M.S. 2008 Liquid-liquid extraction of bromelian and polyphenol oxidase using aqueous two-phase systems. *Chemical Engineering and Processing*. 47:83-89.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizin the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72 (1): 248-254.

Chethana, S.; Nayak, C.A.; Raghavarao, K.S.M.S. 2007. Aqueous two phase extraction for purification and concentrations of betalains. *Journal of Food Engineering*, 81: 679-687.

Chouyyok, W.; Wongmongkol, N.; Siwarungson, N.; Prichanont, S. 2005. Extraction of alkaline protease using an aqueous two-phase system from cell free *Bacillus subtilis* TISTR 25 fermentation broth. *Process Biochemistry*, 40: 3514-3518.

Falahatpishe, H.; Jalali, M.; Badami, N.; Mardani, N.; Khosravi-Darani, K. 2007. Production and purification of a protease from an alkalophilic *Bacillus* sp. 2-5 strain isolated from soil. *Iranian Journal of Biotechnology*, 5 (2): 110-113.

Gavazane, M.R.; Gaikar, V.G. 2003. Aqueous two-phase affinity partitioning of penicillin acylase from *E.coli* in presence of PEG-derivates. *Enzyme and Microbial Biotechnology*, 32: 665-675.

Gbolagade, J.S. 2006. The effect of different nutrient sources on biomass production of *Lepiota procera* in submerged liquid cultures. *African Journal of Biotechnology*, 5 (12): 1246-1249.

Hahn, J.H.; Lee, C-L. 1997. Determining isoelectric point of model proteins and *Bacillus subtilis* neutral protease by the cross partitioning using poly (ethylene glycol)/Dextran aqueous two phase systems. *Colloids and Surfaces*, 9: 131-137.

Imelio, N.; Marini, A.; Spelzini, D.; Picó, G.; Farruggia, B. 2008. Pepsin extraction from bovine stomach using aqueous two-phase systems: molecular mechanism and influence of homogenate mass and phase volume ratio. *Journal of Chromatography B*, 873: 133-138.

Joo, H.S.; Chang, C.S. 2005. Production of protease from a newly alkalophilic *Bacillus* sp I-312 grown on soybean meal: optimization and novel properties. *Process Biochemistry*, 40: 1263-1270.

Kirsch, L.S.; Caldas, J.S.; Moreira, L.C.; Porto, A.L.F.; Teixeira, M.F.S. Produção de proteases por *Lentinus citrinus* Walleye e Rammeloo. In: I Workshop Internacional em Biotecnologia/III Encontro Alfa-Valnatura/ III Jornada Científica do Lika, 2008, Recife. *Resumos*. Recife.

Klomklao, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Simpson, B.K.; Kishimura, H. 2005. Partitioning and recovery of proteinase from tuna spleen by aqueous two-phase systems. *Process Biochemistry*, 40: 3061-3067.

Laxman, R.S.; Sonawane, A.T.; More, S.V.; Rao, B.S.; Rele, M.V.; Jogdad, V.V.; Deshpande, V.V.; Rao, M.B. 2005. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Conidiobolus coronatus*. *Process Biochemistry*, 40: 3152-3158.

Leighton, T.J.; Doi, R.H.; Warren, R.A.; Kelln, R.A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 76: 103-122.

Mayolo-Deloisa, K.; Trejo-Hernández, M.R.; Rito-Palomares, M. 2009. Recovery of a laccase from the residual of *Agaricus bisporus* in aqueous two-phase system. *Process Biochemistry*, 44 (4): 435-439.

Mazzola, P.G.; Lopes, A.M.; Hasmann, F.A.; Jozala, A.F.; Penna, T.C.; Magalhães, P.O.; Rangel-Yagui, C.O.; Pessoa Jr, 2008. A. Liquid-liquid extraction of biomolecules: an overview and update of the main techniques. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83: 143-157.

Nalinanon, S.; Benjakul, S.; Visessanguan, W.; Kishimura, H. 2009. Partitioning of protease from stomach of Albacore Tuna (*Thunnus alalunga*) by Aqueous Two-Phase Systems. *Process Biochemistry*, v. 44 (4):471-476.

Neto B.B; Scarminio, I.C.; Bruns, R.E. 2007. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2 ed. Campinas: Unicamp, 480p.

Nitsawang, S.; Hatti-Kaul, R.; Kanasawu, P. 2006. Purification of papain from *Carica papaya* latex: Aqueous two-phase extraction versus two-step salt precipitation. *Enzyme and Microbiology Technology*, 39: 1103-1107.

Porto, T.S ; Monteiro, T.I.R.; Moreira, K.A.; Lima-Filho, J.L.; Silva, M.P.C.; Porto, A.L.F.; Carneiro da Cunha, M.G. 2005. Liquid-liquid extraction of an extracellular alkaline protease from fermentation broth using aqueous two-phase and micelles systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (5): 655-659.

Porto, T.S ; Medeiros e Silva, G.M; Porto, C.S.; Cavalcanti, M.T.H.; Neto, B.B.; Lima-Filho, J.L.; Converti, A.; Porto, A.L.F.; Pessoa Jr, A. 2008. Liquid-liquid extraction of proteases from fermentation broth by PEG/citrate aqueous two-phase system. *Chemical Engineering and Processing*, 47: 716-721.

Rollan, M.G. 2003. *Cultivo de setas y trufas*. 4ed. Madrid: Mundi Prensa, 2003. 239pp.

Sabotic, J.; Treek, T.; Popovic, T.; Brzin, J. 2007. Basidiomycetes harbor a hidden treasure of proteolytic diversity. *Journal of Biotechnology*, 128 (2): 297-307.

Thys, R. C.S.; Guzzon, S.O.; Cladera-Oliveira, F.; Brandelli, A.2006. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 41: 67-73.

5. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos experimentos realizados pode-se concluir que:

- *L. citrinus* DPUA 1535, nas condições experimentais, cresce a 25 °C, condição que o classifica como fungo mesófilo;
- *L. citrinus* DPUA 1535 expressa crescimento máximo e atividade proteolítica no meio de cultivo contendo fontes orgânicas de carbono, nitrogênio e pH neutro.
- O sistema PEG-fosfato mostrou ser uma ferramenta simples, economicamente viável e promissora como primeiro passo nas etapas de purificação de enzimas proteolíticas de *L. citrinus* DPUA 1535.