



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

**PRODUÇÃO DE PROTEASE PELA ACTINOBACTÉRIA *Streptomyces capoamus*
ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* DA CAATINGA**

LEILA VIVIANY ARAÚJO COELHO

RECIFE

2019

LEILA VIVIANY ARAÚJO COELHO

**PRODUÇÃO DE PROTEASE PELA ACTINOBACTÉRIA *Streptomyces capoamus*
ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* DA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

Área de concentração: Bioquímica e Fisiologia

Orientador: prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira Silva

RECIFE

2019

Côelho, Leila Viviany Araújo

Produção de protease pela actinobactéria *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis* da caatinga / Leila Viviany Araújo Côelho – 2019.

49 f. : il., fig., tab.

Orientador: Thiago Henrique Napoleão

Coorientadora: Leonor Alves de Oliveira Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia, Recife, 2019. Inclui referências.

1. Enzimas proteolíticas 2. *Streptomyces* 3. Rizosfera I. Napoleão, Thiago Henrique (orient) II. Silva, Leonor Alves de Oliveira (coorient.) III. Título

572.76CDD (22.ed.)UFPE/CB – 2022-171

LEILA VIVIANY ARAÚJO COELHO

**PRODUÇÃO DE PROTEASE PELA ACTINOBACTÉRIA *Streptomyces capoamus*
ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* DA CAATINGA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da Universidade Federal de Pernambuco como um parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia.

APROVADA EM: 26/02/2019

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão (Membro Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Nataly Diniz de Lima Santos (Membro Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Lidiane Pereira de Albuquerque (Membro Externo)

Universidade Federal do Piauí

Dra. Marília Cavalcanti Coriolano (Membro Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

“A Deus, aos meus pais e à minha família”

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas bênçãos e oportunidades cedidas, sem as quais não teria conseguido absolutamente nada. À minha família pelo apoio, mesmo não entendendo a maioria das minhas escolhas. À minha querida orientadora e amiga Profa. Dra. Leonor Alves de Oliveira da Silva pela sua paciência e dedicação por todos esses anos.

Ao Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão pela paciência, confiança e ensinamentos.

À Profa. Norma Gusmão pelo apoio e incentivo de sempre.

Aos meus grandes amigos do Danti e do Bioprot que conquistei nessa caminhada. À Patrícia por toda amizade, ensinamentos de banca e da vida. Ensinamentos que ajudaram na minha construção profissional e como ser humano. A você serei grata eternamente.

A Rafael, meu noivo, parceiro e melhor amigo, pela paciência, dedicação, por todo seu carinho, amor e por todas as palavras de conforto desde a seleção do mestrado até o dia de hoje.

Obrigada, amor!

A presença de todos em minha vida fez com que eu concluísse mais uma etapa. A todos, minha enorme gratidão, porque um “obrigada” é muito pouco.

As pessoas sempre culpam as circunstâncias por aquilo que acontecem com elas. Não acredito em circunstâncias. As pessoas que progredem na vida são aquelas que acordam pela manhã e procuram as circunstâncias que desejam, e se não encontram, as criam (SHAW, J.B., 1903).

RESUMO

A produção de enzimas de importância biotecnológica por microrganismos, incluindo as actinobactérias, vem ganhando destaque devido a sua alta utilização no mercado. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas para produção de protease por *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis*, bem como purificar, caracterizar parcialmente e avaliar a atividade antimicrobiana de uma protease. Inicialmente, as fontes de carbono (gelatina, farinha de trigo integral, soro de leite bovino, farinha de soja e pó da folha de macaxeira) foram avaliadas a fim de determinar o melhor substrato para produção de proteases. A atividade proteolítica nos filtrados metabólicos foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. A fim de otimizar as condições de produção, realizou-se dois planejamentos fatoriais em delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR), avaliando a concentração da fonte de carbono, temperatura e pH. Para a purificação de protease, o extrato bruto do filtrado metabólico foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz DEAE Sphadex A25. A protease purificada foi avaliada quanto à massa molecular nativa, temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade frente ao aquecimento e diferentes valores de pH e susceptibilidade a inibidores enzimáticos. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana da protease. O pó da folha de macaxeira mostrou-se a melhor fonte de carbono para a produção de proteases. Os resultados de DCCR indicaram que as condições para produção dessas enzimas pelo isolado estudado são pH 7,5, temperatura 40 °C e concentração de pó da folha de macaxeira a 2%. Apresentou atividade proteolítica 33,7 U/mg. Cromatografia de gel filtração de P2 revelou um único pico proteico, de massa molecular nativa de 14 kDa, revelando a homogeneidade da preparação. A protease presente em P2 apresentou temperatura ótima de 65 °C e pH ótimo 8,0. A enzima foi estável quando incubada em uma ampla faixa de pH e aquecida até 60°C. A atividade proteolítica de P2 foi inibida principalmente por DTT, sugerindo a presença de pontes dissulfeto importantes para manutenção da estrutura funcional da enzima. A protease mostrou uma boa resistência ao agente desnaturante SDS, tendo a atividade reduzida em apenas 29%. P2 não apresentou atividade antimicrobiana. Em conclusão, *S. capoamus* isolada *C. pyramidalis* foi capaz de produzir protease, sendo a melhor fonte de carbono o pó de folha de macaxeira. Uma protease termoativa e alcalina de aproximadamente 14 kD.

Palavras-chave: *Streptomyces*; Protease microbiana; *Caesalpinia pyramidalis*.

ABSTRACT

The production of enzymes of biotechnological importance by microorganisms, including actinobacteria, has been gaining prominence due to its high use in the market. The objective of this work was to determine the optimal conditions for protease production by *Streptomyces capoamus* isolated from the rhizosphere of *Caesalpinia pyramidalis*, as well as to purify, partially characterize and evaluate the antimicrobial activity of a protease. Initially, the carbon sources (gelatine, whole wheat flour, bovine whey, soy flour and manioc leaf powder) were evaluated in order to determine the best substrate for protease production. The proteolytic activity in the metabolic filtrates was evaluated using azocasein as a substrate. In order to optimize the production conditions, two factorial designs were carried out in a central composite design with rotational points (DCCR), evaluating the concentration of the carbon source, temperature and pH. For protease purification, the crude extract of the metabolic filtrate was subjected to ion exchange chromatography in a DEAE-Sephadex A25 matrix. The purified protease was evaluated for native molecular weight, optimal temperature, optimum pH, stability in the face of heating and different pH values and susceptibility to enzyme inhibitors. The antimicrobial activity of the protease was also evaluated. The powder of the manioc leaf proved to be the best carbon source for the production of proteases. The DCCR results indicated that the conditions for the production of these enzymes by the studied isolate are pH 7.5, temperature 40 ° C and powder concentration of the manioc leaf at 2%. It had 33.7 U / mg proteolytic activity. P2 filtration gel chromatography revealed a single protein peak, with a native molecular mass of 14 kDa, revealing the homogeneity of the preparation. The protease present in P2 showed an optimum temperature of 65 ° C and an optimum pH of 8.0. The enzyme was stable when incubated over a wide pH range and heated to 60°C. The proteolytic activity of P2 was mainly inhibited by DTT, suggesting the presence of important disulfide bridges for maintaining the functional structure of the enzyme. The protease showed good resistance to the SDS denaturing agent, with activity reduced by only 29%. P2 did not show antimicrobial activity. In conclusion, *S. capoamus* isolated *C. pyramidales* was able to produce protease, the best source of carbon being the powder of the cassava leaf. A thermoactive, alkaline protease of approximately 14 kD.

Keywords: *Streptomyces*; Microbial protease; *Caesalpinia pyramidalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de mecanismos de catálise enzimática de serino proteases (a), cisteíno proteases (b), aspártico protease (c) e glutâmico proteases (d).....	16
Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de <i>Streptomyces</i> sp.....	17
Figura 3. Região ocupada pela Caatinga.....	23
Figura 4. Diversas paisagens da Caatinga.....	24

ARTIGO

Figura 1: Produção de proteases extracelulares por <i>S. capoamus</i> utilizando diferentes fonte de carbono em substituição a glicose	33
Figura 2. Gráfico de Pareto do primeiro planejamento 2^3 com quatro pontos centrais para a produção de protease por <i>Streptomyces capoamus</i> , em fermentação líquida com condição estacionária por 7 dias.....	34
Figura 3. Gráfico de Pareto em DCCR na produção de protease por <i>Streptomyces capoamus</i> , em fermentação líquida com condição estacionária por 7 dias.....	35
Figura 4. Superfície de resposta da relação entre concentração versus temperatura versus atividade proteolítica.....	37
Figura 5. Superfície de resposta da relação entre concentração versus pH versus atividade proteolítica.....	37
Figura 6. Superfície de resposta da relação entre temperatura versus pH versus atividade proteolítica.....	38
Figura 7. Cromatografia de troca iônica do extrato bruto do líquido metabólico de <i>S capoamus</i> em matriz DEAE-Sephadex	38
Figura 8. Cromatografia de gel filtração de P2 em coluna Hiprep Sephacryl 16/60 S100-HR sentação da anatomia da pele.....	39
Figura 9. Atividade proteolítica de P2 em diferentes temperaturas de incubação.....	40
Figura 10. Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de pH de incubação.....	40
Figura 11. Estabilidade térmica da protease presente em P2 após prévia incubação.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Combinações dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.....	29
2^3 .	
Tabela 2 - Combinações dos fatores estudados no planejamento fatorial completo.....	30
DCCR.	
Tabela 3 - Combinações e resultados dos fatores estudados no planejamento fatorial.....	35
completo DCCR.	
Tabela 4 - Sumário de purificação de protease a partir do extrato bruto do líquido.....	37
metabólico de <i>S. capoamus</i> .	
Tabela 5 - Estabilidade da protease presente em P2 após incubação em diferentes.....	41
valores de pH.	
Tabela 6 - Efeito de inibidores na atividade proteolítica de P2.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

RPM	Rotações por minutos
TCA	Ácido tricloroacético
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
SDS	Dodecil sulfato de sódio
EDTA	Ácido etilodiamino tetra-acético
DTT	Ditiotreitol
DEAE	Deitilaminoetil
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
DCCR	Planejamento fatorial composto central rotacional
UIBBM	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.2 OBJETIVOS	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2. Objetivos específicos.....	14
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	14
2.1 PROTEASES E SUAS APLICAÇÕES	14
2.2 ACTINOBACTÉRIAS.....	17
2.2.1 Gênero Streptomyces	19
2.3 PROTEASES MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES.....	20
2.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS MICROBIANAS	21
2.5 Caesalpinia pyramidalis.....	22
3 RESULTADOS	24
4 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

Proteases, também conhecidas como proteinases ou peptidases, são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. A demanda mundial no mercado enzimático gerou um grande interesse em proteases microbianas devido ao rápido crescimento associado à produção de grande quantidade dessas enzimas (o que reduz o custo) e à facilidade com que elas podem ser geneticamente modificadas visando melhorar suas aplicações biotecnológicas (NIYONZIMA e MORE 2015). As proteases são aplicadas em diferentes setores, como indústrias de alimentos, detergentes, couro, produtos farmacêuticos, seda, para recuperação de prata (a partir de filmes de raios-X), bem como na elucidação estrutural de proteínas (SAVITHA et al., 2011).

Muitos micro-organismos, como actinobactérias, fungos e bactérias, produzem estas proteases. As bactérias filamentosas do gênero *Streptomyces* merecem destaque pelo seu alto potencial na produção de inúmeros compostos de interesse industrial, como antibióticos, enzimas, vitaminas, agentes antioxidantes, antifúngicos, entre outros (MARTINS et al, 2003; SINGH et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2016).

A Caatinga abrange uma área de aproximadamente 845.000 km² de região árida do nordeste brasileiro e possui uma vegetação decídua tropical seca, composta de pequenas árvores, arbustos e gramíneas, xerófilos e plantas caducifólias. O solo desse bioma é um ambiente heterogêneo, de elevada complexidade química, física e biológica e onde são encontradas actinobactérias em grande abundância e diversidade. Estes micro-organismos realizam funções primordiais na degradação de substratos ricos em fonte de carbono, dentre eles a celulose. Assim, esses micro-organismos produzem enzimas com alto potencial biotecnológico (TYC et al., 2016; BATTHI et al., 2017).

A otimização de diferentes parâmetros de fermentação, como fonte de carbono, temperatura e pH do meio, pode elevar o rendimento enzimático, sendo uma alternativa promissora para reduzir o desperdício das indústrias e a maximização da produção (BOOMARUNA et al., 2009; LAKSHMI et al., 2014). Portanto, projetar um meio de fermentação apropriado é de importância crucial (ABDELTIF, 2000).

No presente trabalho, planejamentos fatoriais com análises estatísticas foram empregados para otimizar a produção de proteases por cepa de *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera da planta *Caesalpinia pyramidalis* (catingueira), coletada na Caatinga.

Adicionalmente, uma protease foi purificada, caracterizada quanto à massa molecular nativa, temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade frente a aquecimento, diferentes valores de pH e presença de inibidores, bem como avaliada quanto ao potencial antimicrobiano.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Determinar condições ótimas para produção de proteases por cepa de *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis*, assim como purificar e caracterizar uma protease a partir do complexo enzimático secretado pela *S. capoamus*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a produção de proteases por *S. capoamus* utilizando diferentes fontes de carbono no meio indutor;
- Determinar as condições ótimas de concentração da fonte de carbono, temperatura e pH para a produção de protease;
- Purificar protease a partir do extrato bruto do líquido metabólico através de cromatografia de troca iônica;
- Caracterizar a protease quanto à massa molecular nativa, temperatura ótima e pH ótimo;
- Avaliar a estabilidade da protease frente a aquecimento, incubação em diferentes valores de pH e presença de inibidores;
- Avaliar a atividade antimicrobiana da protease purificada.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 PROTEASES E SUAS APLICAÇÕES

As enzimas estão presentes no processo de fabricação de mais de 500 produtos, distribuídos por mais de 150 processos em diferentes indústrias. Aproximadamente 60% das enzimas utilizadas nas indústrias são proteases e há um esforço crescente em descobrir novas

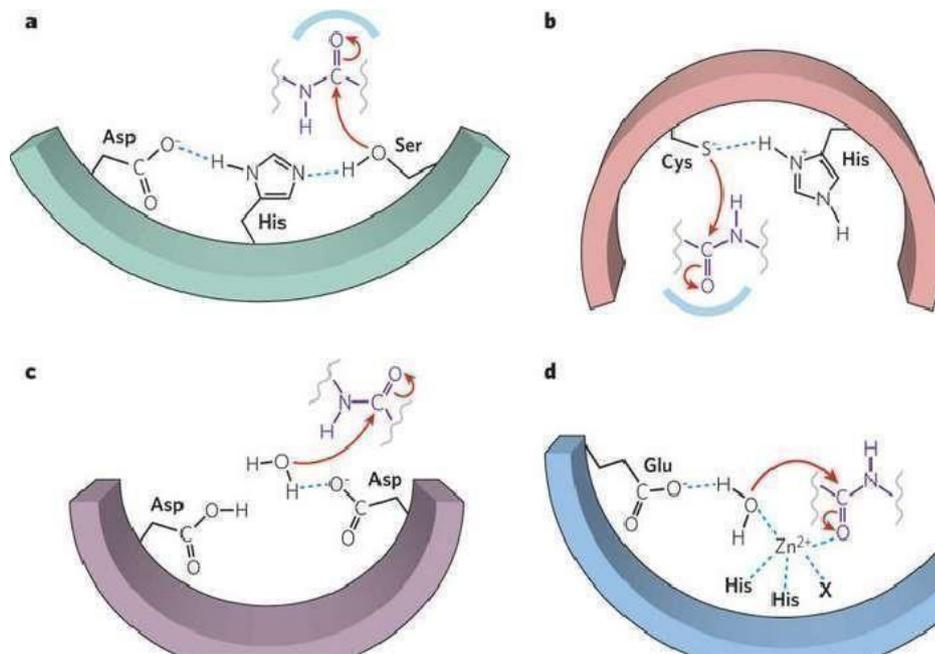
fontes de proteases com alto potencial biotecnológico devido à demanda do mercado (MARATHE et al., 2016; MUTHU et al., 2017).

As proteases são enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas e ocorrem em organismos unicelulares e pluricelulares, onde possuem várias funções fisiológicas, como a digestão, crescimento celular, morfogênese, desenvolvimento, inflamação, ativação de zimogênios e de pró-hormônios, entre outras (GODFREY; WEST, 1996; JOSHI; SATYANARAYANA, 2015, ABDELMOHSEN et al., 2015). Estas enzimas vêm na biotecnologia, principalmente por seu papel fundamental nos processos metabólicos celulares, e pela sua fácil obtenção a partir de micro-organismos como bactérias, actinobactérias, fungos e vírus (KUMAR; TAKAGI, 1999; SILVA et al., 2016).

As proteases são classificadas de acordo com o local do substrato em que realizam a clivagem: as exopeptidases, que clivam ligações peptídicas nas extremidades C ou N-terminal de cadeias polipeptídicas, e as endopeptidases que desfazem ligações peptídicas internas dentro da cadeia polipeptídica (LÓPEZ-OTÍN; BOND, 2008).

A União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classifica as proteases em seis famílias de acordo com a massa molecular, propriedades elétricas e especificidade ao substrato (Figura 1). São elas: serino-proteases, aquelas que possuem em seu sítio ativo um resíduo de serina que é responsável pelo ataque nucleofílico das ligações peptídicas, sendo divididas em sub-classe I (ex. tripsina e elastase) e II (ex. subtilisina); as cisteíno-proteases (ex. papaína), que apresentam no sítio ativo um aminoácido cisteína responsável pelo ataque nucleofílico, enquanto nas treonino-proteases, esse aminoácido é a treonina; nas aspártico e glutâmico proteases, o mecanismo de catálise envolve o ataque das ligações peptídicas por duas moléculas de água associadas ao ácido aspártico ou ácido glutâmico, respectivamente, no sítio ativo, são exemplos a pepsina e a quimosina. E existem as metalo-proteases, que usam um íon metálico no seu mecanismo catalítico, podendo ou não pertencer a uma das classes anteriormente mencionadas (SUMANTHA et al., 2006; SETHI et al., 2016; SOUZA et al., 2017).

Figura 1. Exemplos de mecanismos de catálise enzimática de serino proteases (a), cisteíno proteases (b), aspártico proteases (c) e glutâmico proteases (d)



Fonte: http://www.nature.com/scitable/content/ne0000/ne0000/ne0000/ne0000/14462487/erez_nature08146i1.0_1_2.jpg

As proteases têm ampla aplicabilidade nas indústrias farmacêuticas, cosmetológicas e biomédicas. Estas últimas são utilizadas no tratamento de doenças causadas por fungos, psoríase, queratinização da pele, remoção de calosidades, depilação, regeneração de epitélios e cicatrização na forma de cremes esfoliantes e pomadas, por exemplo, (BRANDELLI et al., 2010). Podem também ser aplicadas no tratamento de patologias clínicas, como na enteropatia sensível ao glúten, sendo utilizadas para hidrolisar o componente tóxico dessa proteína (SHAN et al., 2004).

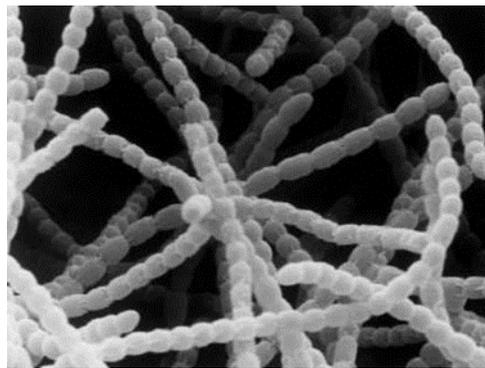
Na indústria alimentícia, as proteases são empregadas na fabricação de cervejas, trituração de cereais, coagulação do leite, produção de hidrolisados de proteínas, panificação e amaciamento da carne (WARD, 2011). As proteases podem ainda substituir produtos químicos no tratamento de peles de animais para a fabricação do couro, diminuindo o impacto ambiental (ZAMBARE et al., 2011). O uso das proteases como aditivos em detergentes serve para acelerar o processo de catálise das ligações peptídicas de componentes proteicos em manchas de ovo e sangue, por exemplo; essas proteases representam um dos produtos com a maior aplicabilidade de enzimas industriais (DEMAIN e ADRIO, 2008).

2.2 ACTINOBACTÉRIAS

O filo Actinobactéria é composto por bactérias Gram-positivas com altos teores de DNA G+C (60-78 mol%) e está dividido em 6 classes, 25 ordens, 52 famílias e 232 gêneros, representando o maior grupo reconhecido de bactérias (SATHYA et al., 2017). As actinobactérias produzem uma ampla variedade de metabólitos secundários, como antibióticos, antifúngicos, enzimas, vitaminas, entre outros (LU et al., 2018; LIU; LIANG, 2014; MACILENTO et al., 2015). Estão presentes em ambientes terrestres, marinhos, regiões de mangue e em condições extremófilas (BALLAV et al., 2015; SHIVLATA; SATYANARAYANA; 2015; BARKA et al., 2016), sendo particularmente abundantes no solo (TAKIZAWA et al., 1993; KINKEL et al., 2012).

As actinobactérias eram consideradas formas de transição entre fungos e bactérias. De fato, eram confundidas com os fungos filamentosos, por produzirem micélios e até mesmo reproduzirem-se por esporulação. O próprio nome actinobactéria remete aos fungos, pois a forma de crescimento com o conjunto de extensão da ponta e ramificação das hifas (Figura 2) se refere às palavras gregas para raio, aktis ou aktin (BARKA et al., 2016).

Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *Streptomyces* sp.



Fonte: www.researchgate.net/figure/Streptomyces-griseus_fig3_324978396

A ordem Actinomycetales compreende filogeneticamente diversas formas morfológicas de bactérias aeróbias e anaeróbias semelhantes e que exibem estruturas ramificadas filamentosas que se fragmentam em formas bacilares ou cocoides. Os gêneros anaeróbicos de importância médica incluem *Actinomyces*, *Arachnia*, *Rothia* e *Bifidobacterium*. Actinomicetos

aeróbicos são um grupo grande e diverso de bactérias Grampositivas que inclui *Gordonia*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Streptomyces* além de vários outros gêneros (JIANG et al, 2018).

As actinobactérias são consideradas uma fonte promissora de compostos bioativos, incluindo enzimas hidrolíticas, com ampla gama de atividades biológicas e propriedades farmacológicas para uso na produção de cosméticos, antibióticos, antioxidantes, antifúngicos e antiparasitários, além de aplicações nas indústrias têxtil e alimentícia (ARUL et al., 2014; BENHADJ; GACEMI-KIRANE, 2016). Apesar dos muitos benefícios citados, as actinobactérias também são patogênicas para plantas, animais e o homem. Doenças de plantas como a podridão da batata-doce e doenças humanas, como tuberculose, para-tuberculose, micetomas, actinomicose, pneumonias alérgicas e vários tipos de abscessos são causadas por actinomicetos (SOWANI et al., 2019).

As actinobactérias do gênero *Nocardia* são saprófitas do solo, e mais de 85 espécies foram identificadas até o momento. Entre estas 25, estão associadas a infecções humanas, como *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia abscessus*, *Nocardia cyriacigeorgica*, *Nocardia farcinica*, *Nocardia nova*, *Nocardia pseudobrasiliensis*, *Nocardia transvalensis*, *Nocardia veteran* e *Nocardia cerradoensis*. As infecções causadas por esse gênero são geralmente iniciadas por inalação ou através de cortes na pele (nocardiose/celulite cutânea) podendo difundir pelo cérebro, rins, articulações, coração, olhos e ossos (JOHNSON et al, 2013).

Alguns membros do gênero *Gordonia* são patógenos humanos oportunistas. Essas espécies são amplamente distribuídas em ambientes aquático e terrestre. Infecções por *Gordonia* são relatadas em locais pequenos ou sistêmicos (BLASCHKE et al., 2007; RAMANAN et al., 2013). As bactérias do gênero *Rhodococcus* são bastonetes aeróbios, patógenos bem reconhecidos na medicina veterinária e que também afetam os seres humanos. A maioria dos casos foi relatada em pacientes imunocomprometidos com transplantes de órgãos ou com infecção pelo vírus da imunodeficiência humana. *Rhodococcus equi*, é a mais comum, habitando nos solos e a inalação de poeira deve ser a principal via de exposição tanto para animais como para o homem, causando pneumonia (RAHAMAT-LANGENDOEN et al., 2009).

Entre as espécies bem estabelecidas, as do gênero *Streptomyces* são utilizadas biotecnologicamente, destacando-se por sua alta capacidade de produzir biocompostos extracelulares, como proteases (SILVA et al., 2016).

2.2.1 Gênero *Streptomyces*

O gênero *Streptomyces* pertence à família Streptomycetaceae. Os representantes desse gênero são bactérias aeróbias formadoras de micélio que raramente se fragmenta e podem produzir pigmentos solúveis. Seu crescimento ocorre entre 25-37°C, embora haja espécies psicrófilas e termófilas. Ainda, seu crescimento é favorecido em pH entre 6,5 e 8,0 e apresentam poucas espécies patogênicas a animais e ao homem (KÄMPFER, 2012). Bactérias do gênero *Streptomyces* podem ser obtidas de amostras de solo marinho, água do mar, crustáceos, solo de diferentes biomas, tubérculos, fontes termais e rizosfera, entre outros (KHATTAB et al., 2016; RASHAD et al, 2015).

A produção de múltiplas moléculas com aplicação biotecnológica é uma característica do gênero *Streptomyces*. Sua principal utilização é na produção de compostos antimicrobianos, mas também existem inúmeros relatos destas linhagens sendo utilizadas na produção de diversas enzimas para aplicação em biorremediação de efluentes, biocontrole de pragas, fabricações de papel, fabricação de alimentos, entre outras (PILLAI; GIRISH; AGSAR, 2016; AWAD et al, 2014; CHENG et al, 2014; XU et al, 2016).

Biocompostos com alto potencial biotecnológico são produzidos por diversos *Streptomyces*, tais como a validamicina A, um antifúngico produzido em condições ótimas por *Streptomyces hygroscopicus* (JIANG et al, 2018). Martins e Souto-Maior (2003) utilizaram *Streptomyces capoamus* para a produção de antaciclina, importantes agentes anticancerígenos. Chen e colaboradores (2018) utilizaram um isolado de *Streptomyces* sp. como produtor de um inibidor de proteases ativo contra uma enzima do HIV-1.

Na literatura, há diversos isolados de *Streptomyces* produtores de proteases e outras enzimas. Por exemplo, os isolados denominados *Streptomyces padanus* (1N) e 4H, obtidos da rizosfera de *Paullinia cupana* do Amazonas, foram capazes de produzir protease, lipase, amilase e fosfatase alcalina utilizando o resíduo de castanha-do-Brasil como fonte de carbono em fermentação em estado sólido e submersa em meio ISP-2, pH 7,2 a 37°C por 15 dias (COELHO et al., 2017). Também foram relatadas espécies com potencial para produção de proteases, como *Streptomyces microflavus*, *Streptomyces moderatus*, *Streptomyces rectus* e *Streptomyces rectus* var. *proteolyticus* (VELOORVALAPPIL et al., 2013).

2.3 PROTEASES MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES

Os micro-organismos apresentam alta capacidade de crescimento, de forma que enormes quantidades de enzimas podem ser produzidas em um curto período de tempo. Além disso, as enzimas microbianas são bem padronizadas, o que permite a sua comercialização (GOYALA; PHUTELA, 2018). Enzimas produzidas por micro-organismos são potenciais biocatalisadores para um grande número de reações e geralmente são consideradas seguras e funcionais numa ampla faixa de temperatura, pH, concentração de substrato ou outras condições. Diversas proteases microbianas de natureza extracelular são excretadas diretamente no caldo de fermentação, formado por um meio indutor de proteases. Isso simplifica a purificação da enzima em comparação com enzimas obtidas de plantas e animais (SHARMA et al., 2015).

Rekik e colaboradores (2019) purificaram e caracterizaram uma protease extracelular (chamada SAPRH) produzida por *Bacillus safensis*, linhagem RH12, isolada do fundo do mar Mediterrâneo num campo de petróleo da Tunísia. A enzima foi purificada até a homogeneidade, utilizando fracionamento salino e cromatografia de troca aniônica. A SAPRH apresentou atividade ótima em pH 9,0 e temperatura 60°C. A caracterização da SAPRH demonstra sua estabilidade sob ampla temperatura e pH, mesmo na presença de surfactantes não-iônicos, agentes oxidantes, branqueadores e alguns detergentes comerciais líquidos e sólidos. A enzima exibiu excelente estabilidade e compatibilidade com surfactantes e detergentes comerciais, revelando 90% de estabilidade com SDS e 100% de estabilidade com classe comercial de detergente para roupas. Tendo em vista a melhor estabilidade em pH elevado e com diferentes detergentes comerciais, a SAPRH pode ser aplicada na indústria de lavanderias.

Não menos importante, isolado de *Streptomyces gulbargensis* foi utilizado para a produção de enzima proteolítica estável, usando farelo de trigo como substrato sob fermentação em estado sólido por 7 dias. Os estudos de fermentação indicaram que a produção de enzima foi máxima às 120 h de fermentação e a enzima foi parcialmente purificada usando sulfato de amônio a 70%. A caracterização da enzima mostrou que ela é ativa a 45 °C e pH 9,0 tendo como substrato a caseína. A protease foi adicionada a um detergente comercial e, posteriormente, avaliada para o desempenho de lavagem de manchas de sangue, sendo observado que após 20 min as manchas foram completamente removidas. Estes resultados indicam claramente que a enzima é estável na presença de detergentes. O desempenho da

lavagem de manchas de sangue em tecidos de algodão e em instrumentos cirúrgicos mostrou um aumento na eficácia com o tratamento enzimático (VISHALAKSHI et al., 2009).

Padmapriya e Williams (2012) isolaram *Bacillus subtilis* coletado do solo em Tirunelveli para a produção de proteases. A protease foi parcialmente purificada com sulfato de amônio e posteriormente dialisada. Na análise por zimografia, foi verificado um peso molecular de 50 kDa. A protease tem um pH ótimo de 7,0, que é uma característica típica de proteases neutras. A temperatura ótima foi de 37 °C e a enzima se mostrou estável até 60 °C. Os melhores substratos de carbono e nitrogênio para produção de protease foram o amido e o soro de leite, numa condição rotacionária de 180 rpm por 24 h.

Segundo Silva e colaboradores (2015) *Streptomyces* sp. DPUA 1576, isolada de líquens da Amazônia, foi estudada para a produção proteases fibrinolíticas. Um experimento fatorial foi aplicado para otimizar a produção de enzimas proteases com duas variáveis independentes: farinha de soja e concentrações de glicose. O extrato bruto foi submetido à atividade fibrinolítica em placa de agarose, sendo verificado que DPUA1576 é um microorganismo adequado à produção de protease fibrinolítica.

A protease ácida de *Aspergillus usamii* tem sido empregada com sucesso para a melhoria das propriedades funcionais do glúten de trigo. Através de planejamentos fatoriais, foram selecionados o pH e a temperatura ótima, além do melhor tempo de hidrólise para obter a melhor condição de hidrólise do glúten do trigo. A hidrólise enzimática degradou a maioria dos peptídeos acima de 10 kDa em peptídeos muito menores. Com a alteração da estrutura secundária e terciária do glúten durante a hidrólise enzimática, formou-se uma estrutura mais extensiva, levando ao aumento das propriedades funcionais (DENG et al., 2016).

2.4 OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MOLÉCULAS MICROBIANAS

A potencialização da produção de biomoléculas de origem microbiana e elaboração de meios de produção rentáveis são muito importantes para o rendimento e a produtividade e, assim, minimizar o custo de produção (ABDEL-FATTAH et al., 2005). A otimização de diferentes parâmetros de fermentação, como fonte de carbono, temperatura e pH do meio, pode elevar o rendimento para a indústria (BOOMINADHAN et al., 2009; ARUNA et al., 2014; LAKSHMI et al., 2014).

O planejamento fatorial fracionário é uma combinação empírica de técnicas estatísticas e matemáticas. É uma ferramenta poderosa para otimizar os parâmetros do processo, modelagem interativa, e melhorar o rendimento (SHABBIRI et al., 2012). Neste aspecto, inúmeras pesquisas são formuladas a partir de planejamento fatoriais, tais como a de Dhamodharan e colaboradores (2017) que aperfeiçoaram os melhores métodos para obtenção de proteases fibrinolíticas. Assim, também como Batista e colaboradores (2018) utilizaram um planejamento fatorial 2^4 avaliando a concentração para avaliar fontes de carbono e maximizar a produção de protease.

2.5 *Caesalpinia pyramidalis*

Micro-organismos de ambientes pouco estudados estão sendo considerados como fontes alternativas de biomoléculas com características diferentes das disponíveis no mercado (SALEM et al., 2016; YADAV et al., 2015). A Caatinga é um bioma que se situa na região Nordeste do Brasil e ocupa uma área de 844.453 km² totalizando 11% do território nacional. Ela possui uma grande biodiversidade de espécies vegetais intensamente adaptadas às circunstâncias do meio, como a escassez de água e nutrientes (SILVA et al., 2016).

O termo Caatinga vem do idioma tupi-guarani (ka'a- wood; tinga - branco), que significa floresta branca. O bioma recebeu esse nome devido ao aspecto acinzentado da vegetação caducifólia durante a estação seca. O bioma da Caatinga é a maior savana sazonal da América do Sul. É uma área mais ou menos contínua, com clima quente e semiárido. As plantas exibem características que as tornam totalmente adaptadas às condições da região, podendo ser decíduas, anual herbáceas ou suculentas, ou ser predominantemente arbustivas com espinhos (SILVA et al., 2016). Aproximadamente 70% da Região Nordeste (Figura 3) é coberta pela vegetação da Caatinga e esse bioma engloba os estados de Rio Grande do Norte (95%), Piauí, Ceará (100%), Paraíba (92%), Pernambuco (48%), Alagoas (48%), Sergipe (49%), Bahia (54%) e a região norte do estado de Minas Gerais (2%) (SOUZA et al., 2017; SANTOS et al., 2017).

A vegetação típica da Caatinga faz parte de um conjunto global denominado de Florestas Arbustivas Tropicais Sazonalmente Secas – FATSS (QUEIROZ et al., 2017). A Caatinga possui a maior riqueza de espécies dentre os núcleos de FATSS do Novo Mundo e vastas áreas inexploradas ou pouco estudadas (PENNINGTON et al., 2009; MORO et al., 2014). Atualmente, existem no mínimo 3.150 espécies distribuídas em 950 gêneros e 152

famílias de angiospermas (QUEIROZ et al, 2017). As famílias mais diversas são Fabaceae e Euphorbiaceae, que também são as mais importantes em outros núcleos de FATSS (PENNINGTON et al., 2009). A Caatinga é rica em número de espécies (Figura 4), particularmente nas formações mais abertas como, as formações popularmente conhecidas como Seridó no Rio Grande do Norte e Paraíba (QUEIROZ et al., 2017).

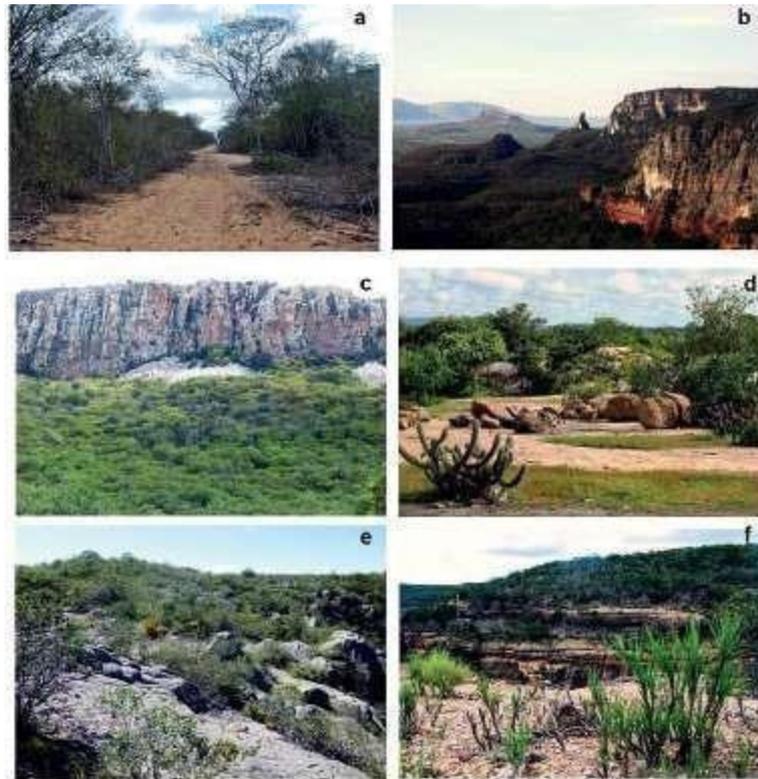
Figura 3. Região ocupada pela Caatinga



Fonte: www.wwf.org.br

Mesmo contendo importantes fontes biológicas para diversas pesquisas, a Caatinga está em um processo severo de desertificação, causado principalmente pelo desmatamento e mau uso dos recursos naturais. A desertificação resulta em redução da produção agrícola e leva a mudanças nas interações que ocorrem no solo, com consequente e muitas vezes irreversível perda de biodiversidade de formas de vida típicas do bioma. A diversidade microbiana deste solo é atípica comparado à de outros biomas, uma vez que esses microorganismos se desenvolvem sob condições de temperaturas extremas e em solos argilosos e pedregosos que podem ter sido influenciados ou não por ações humanas locais (FREITAS et al., 2010; TEXEIRA et al., 2010).

Figura 4. Diversas paisagens da Caatinga.



Fonte: Silva et al. (2016).

A diversidade de micro-organismos no solo da Caatinga ainda não é conhecida o suficiente na literatura. Portanto, um número significativo de pesquisas com microorganismos isolados dos solos dessa região tem sido realizado, tendo em vista seu grande potencial biotecnológico (LUNA et al., 2013; SILVA et al., 2015). No entanto, inúmeros pesquisadores estão isolando, qualificando e quantificando a comunidade microbiana do solo da Caatinga para analisar os metabólitos produzidos e seu potencial biotecnológico como fonte de moléculas de interesse industrial e farmacêutico.

3 RESULTADOS

Os resultados deste relatório são apresentados na forma de artigos.

3.1 MANUSCRITO 1

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR *Streptomyces capoamus* ISOLADA DA RIZOSFERA DE *Caesalpinia pyramidalis* DA CAATINGA

Leila Viviany Araújo Coelho^a, Thales Henrique Barbosa de Oliveira^a, Luana Maria Cavalcante Teixeira^a, Norma Buarque de Gusmão^b, Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho^a, Patrícia Maria Guedes Paiva^a, Leonor Alves de Oliveira da Silva^b, Thiago Henrique Napoleão^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

^bDepartamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Autor para correspondência. E-mail: thiago86@yahoo.com.br

RESUMO

A produção de enzimas de importância biotecnológica por microrganismos, incluindo as actinobactérias, vem ganhando destaque devido a sua alta utilização no mercado. O objetivo deste trabalho foi determinar as condições ótimas para produção de protease por *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis*, bem como purificar, caracterizar parcialmente e avaliar a atividade antimicrobiana de uma protease. Inicialmente, as fontes de carbono (gelatina, farinha de trigo integral, soro de leite bovino, farinha de soja e pó da folha de macaxeira) foram avaliadas a fim de determinar o melhor substrato para produção de proteases. A atividade proteolítica nos filtrados metabólicos foi avaliada utilizando azocaseína como substrato. A fim de otimizar as condições de produção, realizou-se dois planejamentos fatoriais em delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR), avaliando a concentração da fonte de carbono, temperatura e pH. Para a purificação de protease, o extrato bruto do filtrado metabólico foi submetido à cromatografia de troca iônica em matriz DEAESephadex A25. A protease purificada foi avaliada quanto à massa molecular nativa, temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade frente ao aquecimento e diferentes valores de pH e susceptibilidade a inibidores enzimáticos. Também foi avaliada a atividade antimicrobiana da protease. O pó da folha de macaxeira mostrou-se a melhor fonte de carbono para a produção de proteases. Os resultados de DCCR indicaram que as condições para produção dessas enzimas pelo isolado estudado são pH 7,5, temperatura 40 °C e concentração de pó da folha de macaxeira a 2%. Apresentou atividade proteolítica 33,7 U/mg. Cromatografia de gel filtração de P2 revelou um único pico proteico, de massa molecular nativa de 14 kDa, revelando a homogeneidade

da preparação. A protease presente em P2 apresentou temperatura ótima de 65 °C e pH ótimo 8,0. A enzima foi estável quando incubada em uma ampla faixa de pH e aquecida até 60°C. A atividade proteolítica de P2 foi inibida principalmente por DTT, sugerindo a presença de pontes dissulfeto importantes para manutenção da estrutura funcional atividade reduzida em apenas 29%. P2 não apresentou atividade antimicrobiana. Em conclusão, *S. capoamus* isolada C. pyramidales foi capaz de produzir protease, sendo a melhor fonte de carbono o pó de folha de macaxeira. Uma protease termoativa e alcalina de aproximadamente 14 kD.

3.2 INTRODUÇÃO

Proteases, também conhecidas como proteinases ou peptidases, são um grupo de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. A demanda mundial do mercado enzimático gerou um grande interesse em proteases microbianas, devido ao seu rápido crescimento associado à produção de grande quantidade dessas enzimas (o que reduz o custo) e à facilidade com que elas podem ser geneticamente modificadas, visando melhorar suas aplicações em diferentes atividades industriais (NIYONZIMA; MORE 2015). As proteases são aplicadas em diferentes setores, tais como indústrias alimentícia, de detergentes, de couro e farmacêutica (SAVITHA et al., 2011).

A produção de múltiplas moléculas com aplicação biotecnológica é uma característica do gênero *Streptomyces*. Sua principal utilização é na produção de compostos antimicrobianos, mas também existem inúmeros relatos destas linhagens sendo utilizadas na produção de diversas enzimas para aplicação em biorremediação de efluentes, biocontrole de pragas, fabricações de papel, fabricação de alimentos, entre outras (PILLAI; GIRISH; AGSAR, 2014; AWAD et al, 2014; CHENG et al, 2014; XU et al, 2016).

A Caatinga abrange uma área de aproximadamente 845.000 km² de região árida do nordeste brasileiro e possui uma vegetação decídua tropical seca, composta de pequenas árvores, arbustos e gramíneas, xerófilos e plantas caducifólias. No solo desse bioma, ambiente heterogêneo e de elevada complexidade química, física e biológica, são encontradas actinobactérias em grande abundância e diversidade, onde realizam funções primordiais na degradação de substratos ricos em fontes de carbono, tais como

carboidratos complexos e celulose, entre outros. Assim, esses micro-organismos produzem enzimas, dentre elas proteases com alto potencial biotecnológico (TYC et al., 2016; BATTI et al., 2017). A diversidade microbiana no solo da Caatinga é atípica comparado à de outros biomas, uma vez que esses micro-organismos se desenvolvem sob condições de temperaturas extremas e em solos argilosos e pedregosos que podem ter sido influenciados ou não por ações humanas locais (FREITAS et al., 2010; TEXEIRA et al., 2010).

A otimização de diferentes parâmetros de fermentação, como fonte de carbono, temperatura e pH do meio, pode elevar o rendimento enzimático, sendo uma alternativa promissora para reduzir o desperdício das indústrias e a maximização da produção (BOOMARUNA et al., 2014; LAKSHMI et al., 2014). Portanto, projetar um meio de fermentação apropriado é de importância crucial (ABDELTIF, 2000; KRISHNAN et al., 1998).

No presente trabalho, planejamentos fatoriais com análises estatísticas foram empregados para otimizar a produção de proteases por cepa de *Streptomyces capoamus* isolada da rizosfera de *Caesalpinia pyramidalis*. Adicionalmente, uma protease foi purificada, caracterizada quanto à massa molecular nativa, temperatura ótima, pH ótimo, estabilidade frente a aquecimento, diferentes valores de pH e presença de inibidores e avaliada quanto ao potencial antimicrobiano.

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Isolado bacteriano

O isolado de *S. capoamus* 3132 foi obtido da coleção de cultura de micro-organismos (UFPEDA) do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. A actinobactéria foi cultivada em meio sólido ISP-2 ágar a 37 °C por 7 dias para verificação de pureza de colônia.

3.3.2 Ensaio de produção de proteases

O pré-inóculo foi preparado a partir da área central da cultura em meio ISP-2 ágar transferindo, com auxílio de pinça estéril e furador metálico, 5 blocos circulares

semelhantes com 9 mm de diâmetro para Erlenmeyer (150 mL) contendo 50 mL do meio ISP-2 líquido, sendo cultivado sob agitação (120 rpm) a 37 °C por 48 h. Após a obtenção do pré-inóculo, um volume de 5 mL foi inoculado em Erlenmeyer de (150 mL), contendo 50 mL de meio indutor de protease (Extrato de levedura 5 g/L, Peptona 5 g/L, Fosfato dibásico de potássio 10 g/L e Sulfato de magnésio 0,2 g/L, pH 8,5) contendo 1% (m/v) de fonte de carbono. O ensaio foi incubado a 37 °C por 7 dias sob condição estacionária. Os testes foram realizados em triplicata e as fontes de carbono avaliadas são descritas a seguir. Após o período de incubação, o caldo metabólico foi filtrado em papel filtro de 125 mm para a obtenção do extrato bruto, que foi avaliado quanto à atividade proteolítica e concentração de proteínas segundo Bradford (1976). Posteriormente, o material foi armazenado à 4 °C.

3.3.3 Fontes de carbono

Diferentes fontes de carbono foram utilizadas no ensaio de produção de proteases, visando identificar o melhor substrato para realização dos ensaios posteriores: gelatina (Royal®), farinha de trigo integral (in natura), soro de leite bovino (in natura), farinha de soja (in natura) e pó da folha de macaxeira (in natura).

4.3.4 Ensaio de atividade proteolítica

De acordo com Daroit e colaboradores (2009) a atividade proteolítica foi determinada utilizando 30 µL do extrato e 50 µL de azocaseína 1% em tampão Tris-HCl 50 mm, pH 8,5. Após incubação a 45 °C por 1h, a reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm. A reação foi neutralizada pela adição de 280 µL de NaOH 1M a 160 µL e foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade (U) de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,001. Atividade específica (U/mg) correspondeu à razão entre a atividade e a quantidade de proteínas na amostra. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3.5 Determinação da concentração de proteínas

Para a quantificação de concentração de proteínas totais foi utilizada metodologia de Bradford (1976) e curva-padrão de albumina sérica bovina.

4.3.6 Otimização da produção de protease

Para determinar as melhores condições de produção, foi utilizada a melhor fonte de carbono segundo os resultados do teste descrito no tópico 2.4, que foi o pó da folha de macaxeira. Para avaliar o efeito de concentração da fonte de carbono, pH e temperatura na produção de proteases, realizou-se um planejamento fatorial 2^3 e um delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR) (Tabela 1).

Tabela 1. Combinações dos fatores estudados no planejamento fatorial completo 2^3

	Ensaio	Temperatura	pH	Concentração
	1	30 (-1)	5,5 (-1) 5,5	0,4 (-1)
	2	40 (+1)	(-1)	0,4 (-1)
	3	30 (-1)	8,5 (+1)	0,4 (-1)
	4	40 (+1)	8,5 (+1)	0,4 (-1)
Planejamento	5 fatorial	30 (-1)	5,5 (-1)	1,6 (+1)
	6	40 (+1)	5,5 (-1)	1,6 (+1)
	7	30 (-1)	8,5 (+1)	1,6 (+1)
	8	40 (+1)	8,5 (+1)	1,6 (+1)
9 10		35 (0)	7,0 (0)	1,0 (0)
Ponto central		35 (0)	7,0 (0)	1,0 (0)
11		35 (0)	7,0 (0)	1,0 (0)
12	35 (0)	7,0 (0)	1,0 (0)	

Com base nos resultados do planejamento 1, foi realizado um novo planejamento (Tabela 2) no qual foram prescritos quatro níveis, codificados -1,689, -1, 0, +1 e +1,689.

3.3.7 Purificação parcial de protease

O extrato bruto (2 mL; 12,312 U/mg), obtido a partir da melhor condição de produção, foi aplicado em uma coluna (6,5 x 1,5 cm) de DEAE-Sephadex A25 (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) pré-equilibrada com Tris-HCl 50 mM pH 8,0. As proteínas que não adsorveram à matriz foram coletadas na etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio até que fosse atingida uma absorbância menor que 0,025. Em seguida, as proteínas adsorvidas foram eluídas com NaCl 1,0 M. Frações (2,0 mL) foram coletadas e avaliadas quanto à absorbância a 280 nm e aquelas com absorbância maior do que 0,050 foram reunidas e dialisadas para a remoção do sal. Os pools de proteínas não-adsorvidas (P1) e adsorvidas (P2) foram avaliados quanto à atividade proteolítica.

Tabela 2. Combinações dos fatores estudados no planejamento fatorial completo DCCR.

	Ensaio	pH	Temperatura	Concentração
Planejamento fatorial	1	4,5 (-1)	35,34 (-1)	1,0 (-1)
	2	7,5 (+1)	35,34 (-1)	1,0 (-1)
	3	4,5 (-1)	40 (+1)	1,0 (-1)
	4	7,5 (+1)	40 (+1)	1,0 (-1)
	5	4,5 (-1)	35,34 (-1)	2,0 (+1)
	6	7,5 (+1)	35,34 (-1)	2,0 (+1)
	7	4,5 (-1)	40 (+1)	2,0 (+1)
	8	7,5 (+1)	40 (+1)	2,0 (+1)
Pontos centrais	9	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)
	10	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)
	11	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)
	12	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)
	13	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)
14		3,477 (-1,682)	37,67 (0)	1,5 (0)
15		8,523 (+1,682)	37,67 (0)	1,5 (0)
16	Pontos axiais	6,0 (0)	30,34 (-1,682)	1,5 (0)

17			6,0 (0)	45 (+1,682)	1,5 (0)
18			6,0 (0)	37,67 (0)	0,659 (-1,682)
19	6,0 (0)	37,67 (0)		2,341 (+1,682)	

3.3.8 Cromatografia de gel filtração

Para determinação da molecular nativa P2 foi cromatografado em coluna Hiprep 16/60 Sephacryl™ S-100 HR (60 cm x 16 mm) acoplada ao sistema ÄKTA Prime (GE Healthcare Life Sciences, Suécia) e equilibrada com NaCl 0,15 M a um fluxo de 0,5 mL/min a 24 °C. A amostra (200 µg) foi injetada e eluída (frações de 3,0 mL) com NaCl 0,15 M. Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66 kDa, fetuína, 64 kDa, ovoalbumina, 45 kDa, inibidor de tripsina de clara de ovo do tipo III, 28 kDa, e tripsina, 25 kDa) foram similarmente cromatografados.

3.3.9 Caracterização da atividade proteolítica em P2

Para a determinação do pH ótimo para a protease foram utilizados tampões com diferentes valores de pH (5,0; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; 9,0; 10,0 e 11,0). P2 foi incubado em diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55, 65, 75 e 85 °C) a fim de se determinar a temperatura ótima. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

A estabilidade térmica foi avaliada através de incubação de P2 a 40, 50 ou 60 °C por 1, 10, 30 e 60 min na ausência de substrato. As amostras foram então utilizadas para avaliação da atividade proteolítica residual. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A estabilidade frente a diferentes valores de pH foi realizada com amostras de P2 incubadas em diferentes tampões na proporção de 1:1, enzima:tampão (v/v). Foram utilizados os tampões: McIlvaine pH 4,0 a 8,0, glicina pH 9,0 a 10,0 e carbonato de sódio pH 11,0. Após 24 h de incubação a 25 °C, foi determinada a atividade proteolítica residual, conforme descrito anteriormente. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A influência de inibidores enzimáticos também foi considerada usando 10 mM de SDS (Sulfato sódico de dodecila), PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonila) e EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) (WARANGKAR; KHOBRADE, 2010; MONICA et al., 2013).

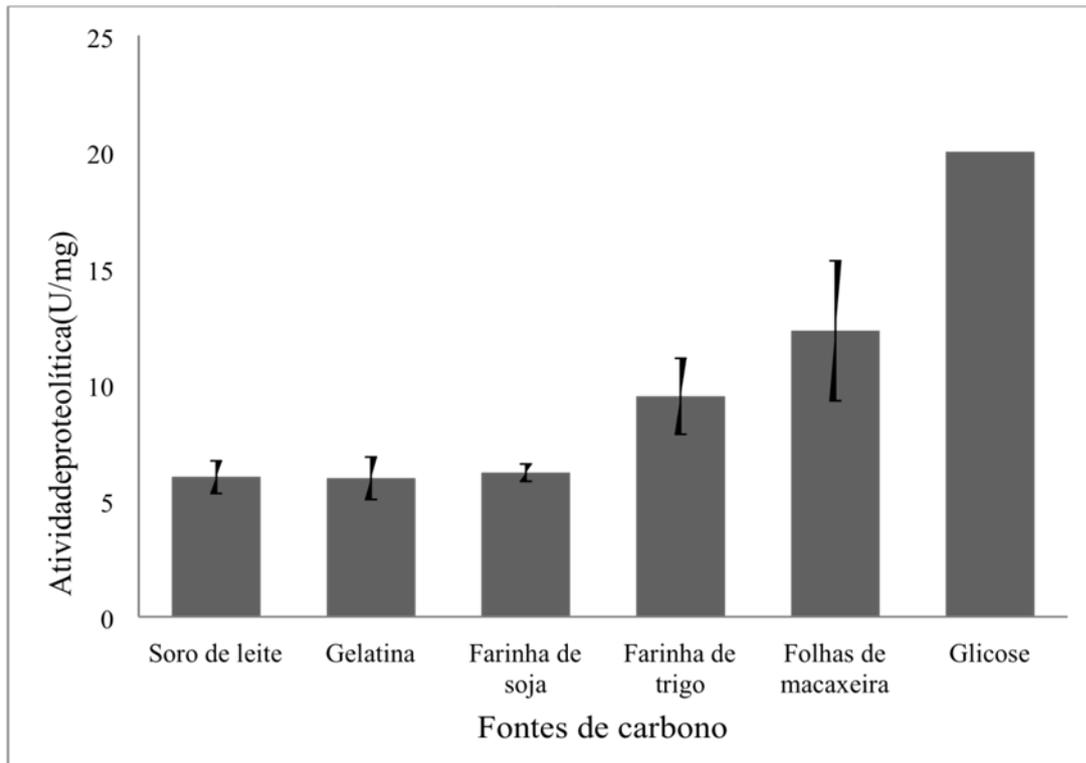
3.3.10 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada segundo Moody e colaboradores (2004) através de perfuração em ágar com a remoção do meio de cultura sólido com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais foi inserido P2. A atividade foi testada contra as cepas *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396), *Shigella flexneri* (UFPEDA 412) e *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 414), todas obtidas da coleção UFPEDA da UFPE.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Visando minimizar os gastos e maximizar a produção de proteases por *S. capoamus*, utilizaram-se cinco fontes de carbono: soro de leite bovino, gelatina, farinha de soja, farinha de trigo integral e o pó da folha de macaxeira, substituindo a glicose no meio indutor de protease. Durante o processo fermentativo, os microrganismos degradam a biomassa vegetal através da produção de enzimas extracelulares (SANTOS et al., 2011). Os melhores resultados foram observados utilizando pó da folha da macaxeira (Figura 1).

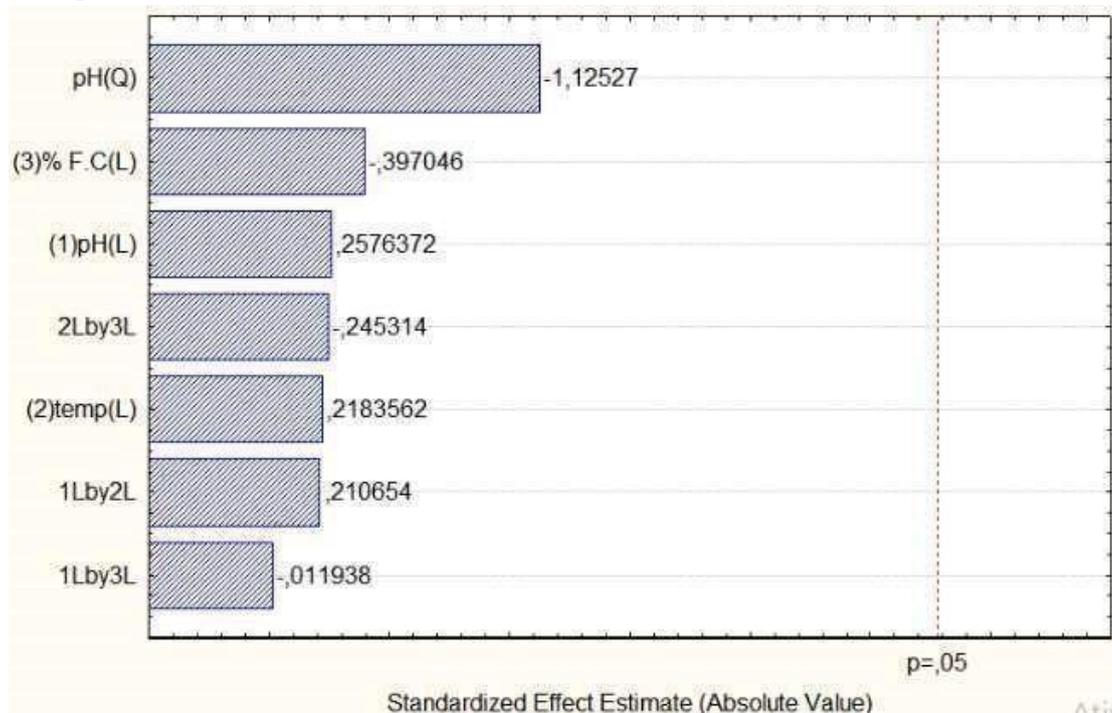
Figura 1. Produção de proteases extracelulares por *S. capoamus* utilizando diferentes fonte de carbono em substituição a glicose.



As folhas de macaxeira são ricas em proteínas, fibras, minerais, vitaminas (A e C) e β caroteno. As proteínas da folha são ricas em ácidos glutâmico e aspártico e em leucina. O processamento permite a obtenção de farinha de macaxeira dentro da faixa não tóxica (TROBINI; LEONEL, 2014).

Tendo o pó da folha de macaxeira como melhor fonte de carbono, realizou-se um planejamento fatorial de 2^3 com quatro pontos centrais para auxiliar na estimativa do erro experimental, sendo avaliados as variáveis de pH (5,5; 7,0 e 8,5), temperatura (30, 35 e 40°C) e a concentração de pó da folha de macaxeira (0,4%, 1,0% e 1,6%) na produção do complexo proteolítico excretado pela *S. capoamus* isolada da rizosfera da Caatinga. De acordo com o primeiro delineamento experimental, foi possível observar que não teve nenhum fator significativo na otimização da produção do complexo enzimático com proteolítico, conforme o diagrama de Pareto (Figura 2).

Figura 2. Gráfico de Pareto do primeiro planejamento 2^3 com quatro pontos centrais para a produção de protease por *Streptomyces capoamus*, em fermentação líquida com condição estacionária por 7 dias.



Com base no primeiro planejamento e com a finalidade de aperfeiçoar o processo de produção do complexo enzimático, um novo delineamento composto central com pontos rotacionais (DCCR) foi realizado. De acordo com gráfico de Pareto (Figura 3), houve correlação significativa com os 3 fatores entre as variáveis. Uma das variáveis independentes que isoladamente teve significância foi a da concentração da fonte de carbono, o pó da folha de macaxeira, a qual influenciou positivamente a produção da protease, numa concentração de 2%. Outra variável independente, a temperatura, apresentou um efeito significativo e positivo. O resultado indicou que as melhores condições para produção da protease são 2% do pó da folha de macaxeira e 40 °C (Figura 4). Bhavani et al. (2012), estudando a linhagem mutante *Streptomyces venezuelae*, também obtiveram melhor resultado na produção da protease a 40 °C.

Figura 3. Gráfico de Pareto em DCCR na produção de protease por *Streptomyces capoaemus*, em fermentação líquida com condição estacionária por 7 dias.

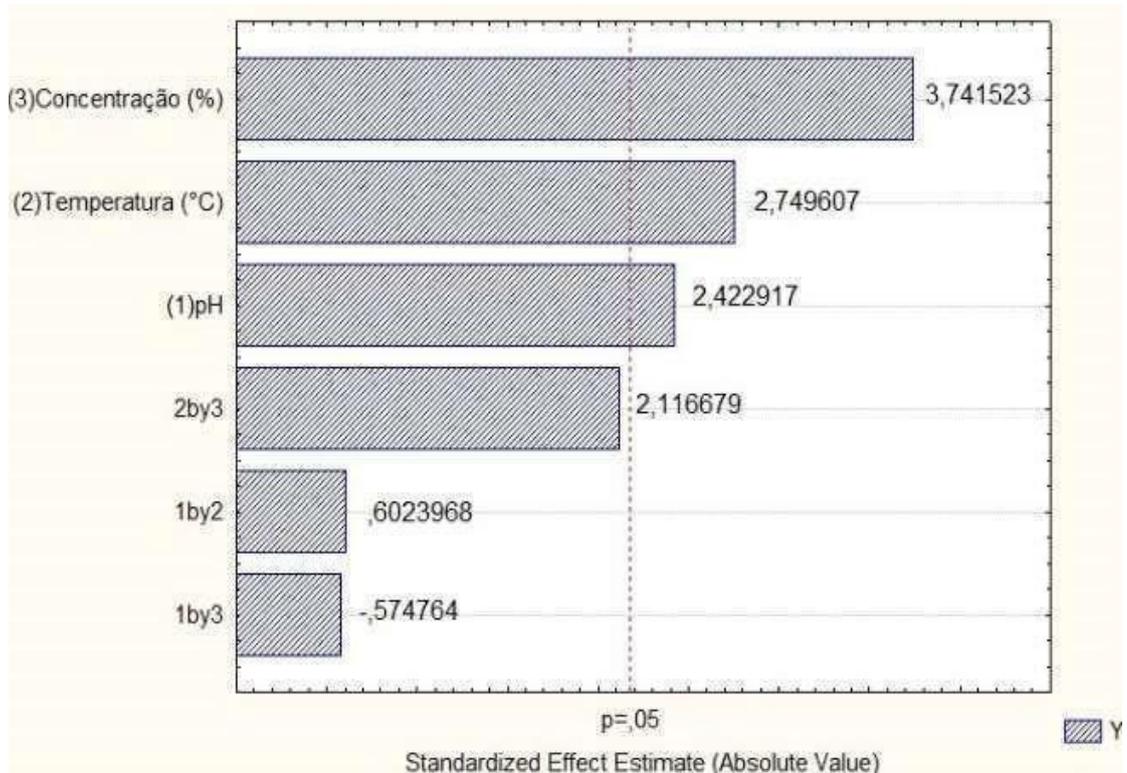
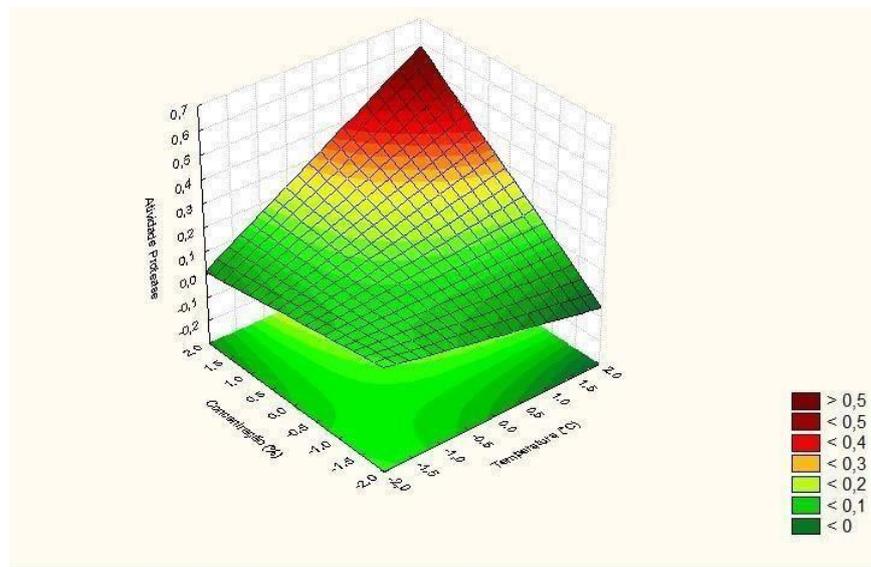


Tabela 3. Combinações e resultados dos fatores estudados no planejamento fatorial completo DCCR

	Ensaio	pH	Temperatura	Concentração	Rendimento U/ml
Planejamento fatorial	1	4,5 (-1)	35,34 (-1)	1,0 (-1)	24,05
	2	7,5 (+1)	35,34 (-1)	1,0 (-1)	12,58
	3	4,5 (-1)	40 (+1)	1,0 (-1)	14,56
	4	7,5 (+1)	40 (+1)	1,0 (-1)	17,99
	5	4,5 (-1)	35,34 (-1)	2,0 (+1)	13,96
	6	7,5 (+1)	35,34 (-1)	2,0 (+1)	16,78
	7	4,5 (-1)	40 (+1)	2,0 (+1)	33,62

	8		7,5 (+1)	40 (+1)	2,0 (+1)	44,03	
	9	10	11	6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)	8,60
				6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)	18,26
				6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)	14,98
Pontos centrais				6,0 (0)		1,5 (0)	14,98
	12			6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)	15,35
	13			6,0 (0)	37,67 (0)	1,5 (0)	8,74
	14			3,477	37,67 (0)	1,5 (0)	17,94
	15			(1,682)	37,67 (0)	1,5 (0)	13,78
	16			8,523	30,34	1,5 (0)	10,59
				(+1,682)	(1,682)		
Pontos axiais				6,0 (0)			
	17			6,0 (0)	45 (+1,682)	1,5 (0)	14,10
	18			6,0 (0)	37,67 (0)	0,659 (-1,682)	14,01
	15			(1,682)	37,67 (0)	1,5 (0)	13,78
				8,523	30,34		
	16			(+1,682)	(1,682)	1,5 (0)	10,59
				6,0 (0)			
Pontos axiais							
	17			6,0 (0)		1,5 (0)	14,10
					45 (+1,682)		
	18			6,0 (0)	37,67 (0)	0,659 (-1,682)	14,01

Figura 4. Superfície de resposta da relação entre concentração versus temperatura versus atividade proteolítica



As variáveis independentes pH e concentração da fonte de carbono (Figura 5) e pH e temperatura (Figura 6) também apresentaram um efeito significativo e positivo para maximização da protease. Diante dos gráficos de superfície de resposta, todas as variáveis independentes influenciam significativamente na produção proteolítica, sendo as melhores condições pH 7,5, temperatura 40 °C e concentração de pó da folha de macaxeira de 2%.

Figura 5. Superfície de resposta da relação entre concentração versus pH versus atividade proteolítica

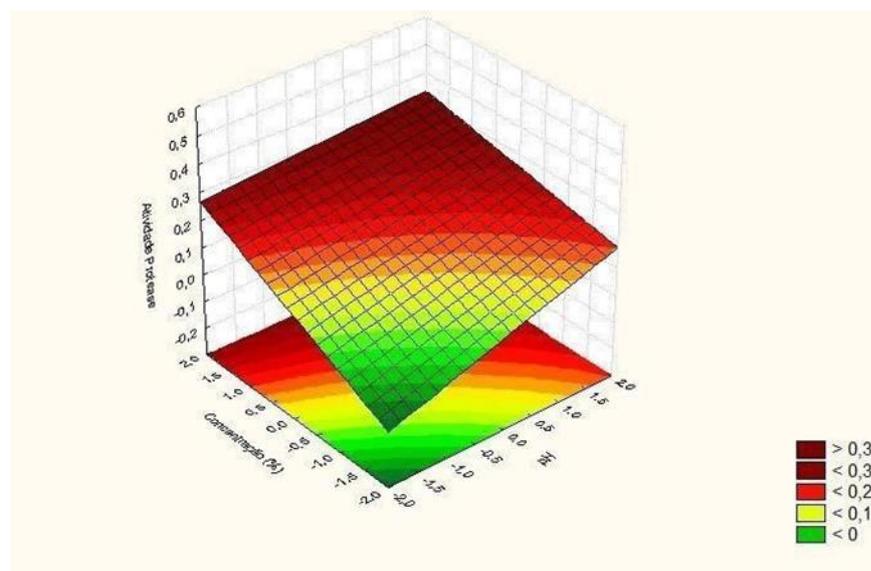
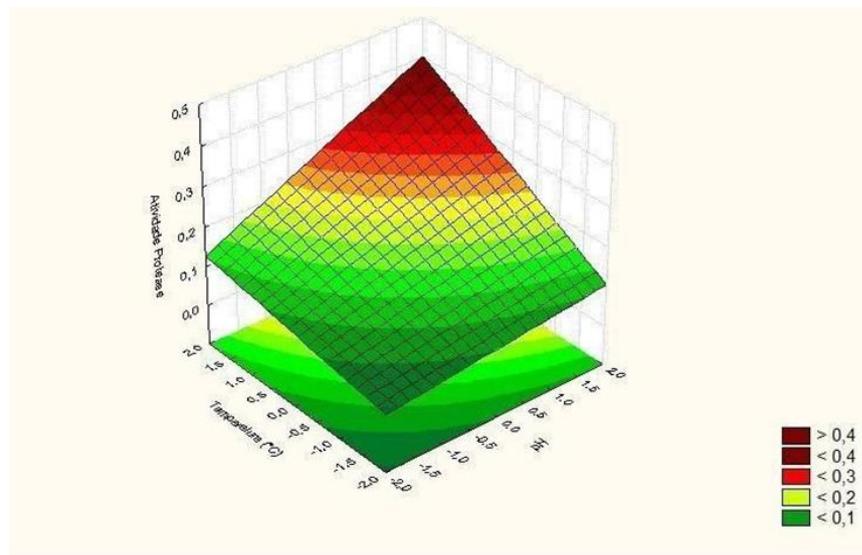


Figura 6. Superfície de resposta da relação entre temperatura versus pH versus atividade proteolítica.



O extrato obtido nas melhores condições de produção foi então submetido à cromatografia de troca iônica (Figura 7). O pico de proteínas não-adsorvidas (P1) não apresentou atividade proteolítica, enquanto o pico de proteínas adsorvidas (P2) apresentou atividade específica de 33,70 U/mg.

Figura 7. Cromatografia de troca iônica do extrato bruto do líquido metabólico de *S. capoamus* em matriz DEAE Sphadex

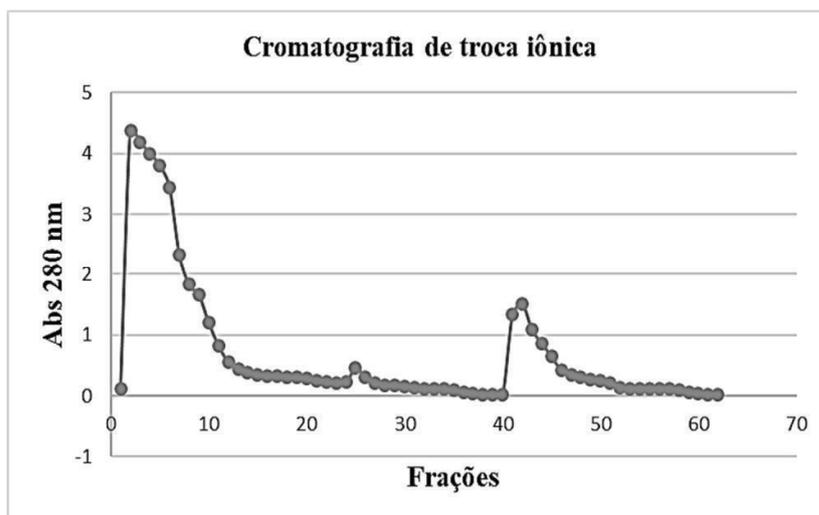


Tabela 4. Sumário de purificação de protease a partir do extrato bruto do líquido metabólico de *S. capoamus*.

Amostra	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)
Extrato	179,12	1,241	144,24	100
P2	28,12	0,848	33,7	15,69

P2 foi então submetido à cromatografia de gel filtração para avaliação da massa molecular nativa das proteínas presentes. Interessantemente, apenas um único pico proteico foi detectado (Figura 8), sugerindo a homogeneidade da preparação. A proteína presente nesse pico apresenta uma massa molecular nativa de 14 kDa.

A protease presente em P2 foi então caracterizada quanto à temperatura ótima. A temperatura ótima foi de 65 °C (Figura 9). Entretanto, observa-se que a atividade da enzima se manteve relativamente estável em temperaturas entre 35 e 65 °C. Esse resultado qualifica essa protease como moderadamente termoativa. Nassar e colaboradores (2015) relataram como uma temperatura ótima de 60°C, para protease alcalina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* isolada do solo do Delta do Nilo do Egito.

Figura 8. Cromatografia de gel filtração de P2 em coluna Hiprep Sephacryl 16/60 S100-HR

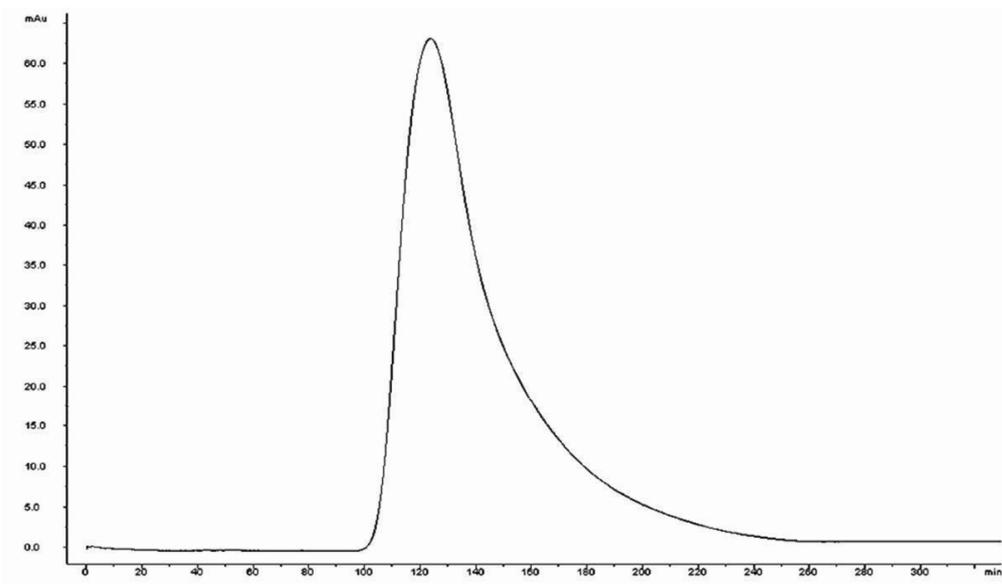
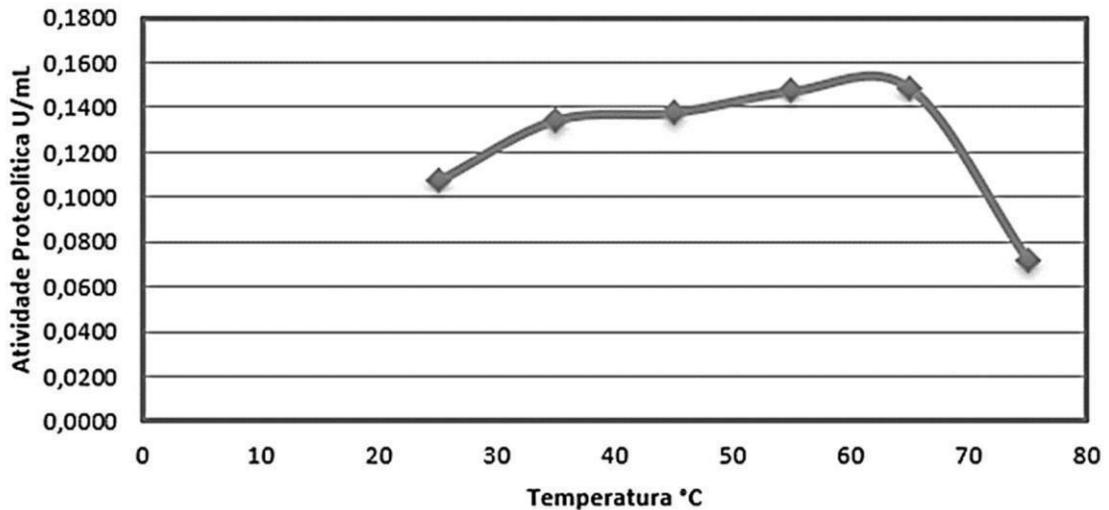
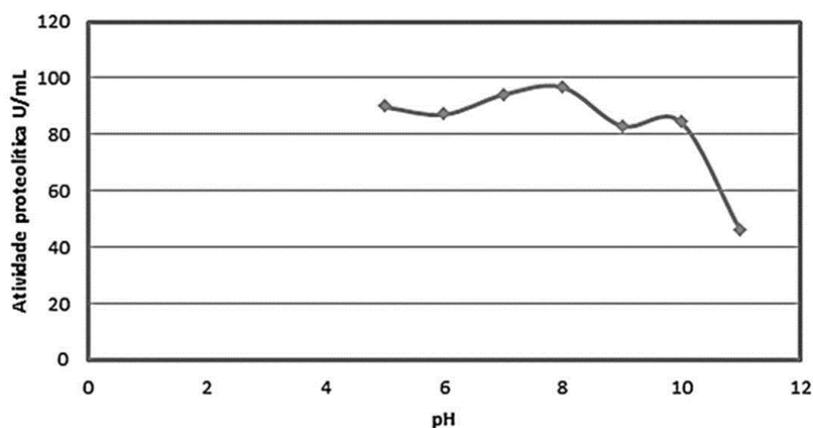


Figura 9. Atividade proteolítica de P2 em diferentes temperaturas de incubação



O perfil de atividade de P2 em diferentes valores de pH revelou que a enzima se manteve estável em valores de pH entre 5,0 e 8,0 (Figura 10). Observou-se que no pH 8,0 a atividade proteolítica foi máxima, caracterizando o pH ótimo. Simkhada et al. (2010) afirmam que a faixa de pH neutro ou alcalino apresentou melhores resultados para a produção de uma protease por *Streptomyces* sp. CS684. Moreira e colaboradores (2001) obteve um pH ótimo de 8,0 para proteases alcalinas produzidas pelo *Streptomyces clavuligerus*.

Figura 10. Atividade proteolítica de P2 em diferentes valores de pH de incubação



A estabilidade da protease previamente incubada em diferentes valores de pH foi avaliada. Os resultados indicaram uma grande estabilidade em todos os valores de pH testados, mantendo atividade máxima quando incubada em pH 10,0 conforme o resultado da Tabela 4. A protease presente P2 demonstrou estabilidade frente ao aquecimento prévio por até 60 min, que corrobora com a Figura 9 e a uma temperatura de 50 e 60 °C; no mesmo período, o ensaio

realizado com a enzima incubada previamente a 30 °C mostrou instabilidade (Figura 11). Ao contrário do relatado por Nassar e colaboradores (2015) para a protease alcalina de *Bacillus amyloliquefaciens*, que tem atividade instável na temperatura ótima.

Tabela 5. Estabilidade da protease presente em P2 após incubação em diferentes valores de pH

pH	Média atividade residual %	Desv padr %
6,0	63,94736842	0,744323
7,0	70,26315789	3,721615
8,0	78,28947368	0,186081
9,0	95,65789474	2,41905
10,0	100	0,186081

A atividade proteolítica de P2 foi inibida principalmente por DTT (Tabela 5), sugerindo a presença de pontes dissulfeto importantes para manutenção da estrutura funcional da enzima. A protease mostrou uma melhor resistência ao agente desnaturante SDS, tendo a atividade reduzida em 29%. Os outros inibidores, EDTA e PMSF, indicando que a enzima provavelmente não é uma metalo ou serino protease.

Figura 11. Estabilidade térmica da protease presente em P2 após prévia incubação

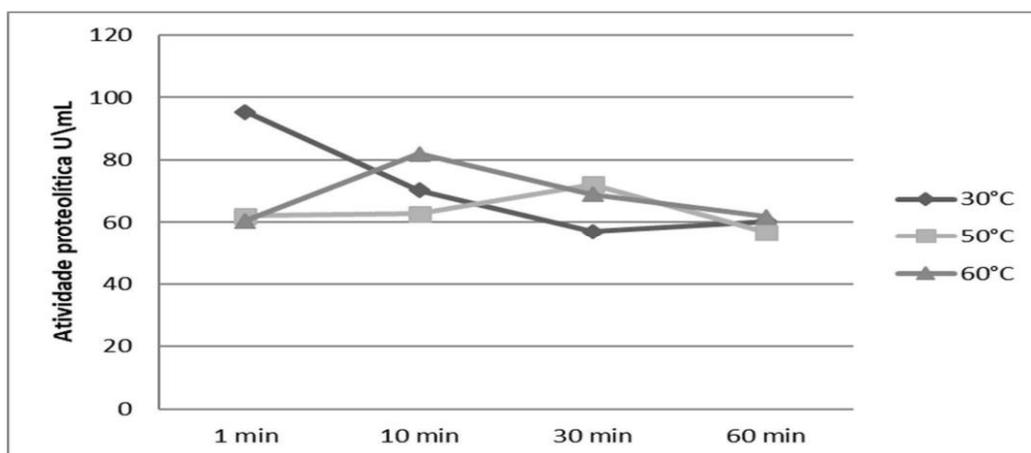


Tabela 6. Efeito de inibidores na atividade proteolítica de P2.

Inibidores	% de inibição
SDS	29,63
EDTA	18,36
DTT	74,31
PMSF	11,74
Pepstatina A	11,92
E-64	13,63
BESTATINA	22,35

A atividade antimicrobiana de P2 foi testada e verificou-se que não houve inibição do crescimento de nenhum dos micro-organismos testados.

3.5 CONCLUSÃO

Streptomyces capoamus isolada da rizosfera de planta da Caatinga é capaz de produzir proteases, sendo a melhor fonte de carbono o pó de folha de macaxeira e as condições ótimas de fermentação 2,0% da fonte de carbono, 65 °C, pH 7,5 em condição estacionária por 7 dias. Uma protease termoativa e alcalina de aproximadamente 14 kDa foi parcialmente purificada a partir do extrato bruto do líquido metabólico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 446902/2014-4) à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Código de Financiamento 001) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE; APQ-0108-2.08/14; APQ-0661-2.08/15) pelo apoio financeiro. L.V.A.Coelho agradece ao CNPq pela concessão de bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELTIF A. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. **J Chem Technol Biotechnol**, p. 223–238, 2000.

BADDOEI-DALFARD, A. E KARAMI, Z., Screening and isolation of an organic solvent tolerant-protease from *Bacillus* sp. JER02: activity optimization by response surface methodology. **J Mol Catal B-Enzym.** n. 89, p. 15–23, 2012.

BASKAR, G. E RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by *Aspergillus terreus* MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-Pac J Chem Eng** 7, 2012.

BOX, G.E.P. E BEHNKEN, D.W., Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics** v. 2.1960.

BRADFORD, MM., Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína utilizando o princípio da ligação proteínacorante. **Anal. Biochem.** p. 248-254, 1976.

HYMAVATHI, M., SATHISH, T., SUBBA, R. E PRAKASHAM, R.S., Enhancement of LAsparaginase production by isolated *Bacillus circulans* (MTCC 8574) using response surface methodology. **Appl Biochem Biotech**, p. 191-198, 2009.

KEILA APARECIDA MOREIRA; MARIA TACIANA HOLANDA CAVALCANTI1;
HELENA SIMÕES DUARTE; ELIAS BASILE TAMBOURGI; EDUARDO
HENRIQUE

MAGALHÃES DE MELO; VALDINETE LINS SILVA; ANA LÚCIA FIGUEIREDO
PORTO; JOSÉ LUIZ DE LIMA FILHO, Partial characterization of proteases from
Streptomyces clavuligerus using an inexpensive. **Medium**, 215-220, 2001.

LAKSHMI BKM, RATNASRI PV, AMBIKADEVI K, HEMALATHA KPJ. Screening,
optimization of production and partial characterization of alkaline protease from
haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **J Res Eng Technol**, v. 3; p. 435- 443, 2014.

MOODY JO, ADEBIYI OA, ADENIYI BA. *Gordonia* and Related Genera as
Opportunistic Human Pathogens Causing Infections of Skin, **Soft Tissues, and Bones**,
2004.

NASSAR FATMA REFAAT, AHMED ABDELWAHAB ABDELHAFEZ, TAREK SAID

ELTAYEB AND SAMAH HASHEM ABU-HUSSEIN, Purification, Characterization and Applications of Proteases Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 35s Isolated from Soil of the Nile Delta of Egypt, **British Microbiology Research Journal**, p.286-302, 2015.

NIYONZIMA F. N., MORE S. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties and stain removal analysis. **Prep Biochem Biotechnol**, p.233-258, 2015.

PLACKETT, R.L. E BURMAN, J.P, The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika** v 33, p.305-325, 1946.

SAVITHA., Fungal protease: Production purification and compatibility with laundry detergent and their wash performance. **J Taiwan Inst Chem Eng**, v. 42, p.298-304, 2011.

THENMOZHIM., KRISHNAN K. Anti-Aspergillus activity of *Streptomyces* sp. isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, **India. J Environ Sci Eng**, v. 2, p. 1-8, 2011

TYC, O. SONG, C; DICKSCHAT, J.S.; VOS, M.; GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v.25, n.4, p. 280-292, 2016.

WARANGKAR, S.C. E KHOBRAGADE C.N., Purification, characterization, and effect of thiol compounds on activity of the *Erwinia carotovora* L-asparaginase. **Enzym Res**, 2010.

4 CONCLUSÃO

O isolado de *Streptomyces capoamus* foi capaz de produzir protease utilizando diferentes fontes de carbono. Atividade proteolítica máxima foi obtida nas seguintes

condições: 2,0% de pó da folha de macaxeira, 40 °C, pH 7,5, em condição estacionária por 7 dias de fermentação.

Uma protease foi parcialmente purificada a partir do extrato bruto do líquido metabólico, sendo uma enzima de aproximadamente 14 kDa e com temperatura ótima de 65°C e pH ótimo 8,0, sendo uma protease moderadamente termoativa e alcalina. A enzima foi estável frente ao aquecimento prévio em uma ampla faixa de temperatura e pH, bem como à presença do agente desnaturante SDS.

REFERÊNCIAS

ABDEL-FATTAH YR, SAEED HM, GOHAR YM, EL-BAZ MA. **Process Biochem**; 40, v.5, 2005.

ABDELTIF A. Effect of inorganic phosphate on lactate production by *Lactobacillus helveticus* grown on supplemented whey permeate. **J Chem Technol Biotechnol**, 2000.

ARUNA K, SHAH J, BIRMOLE R. Production and partial characterization of alkaline protease from *Bacillus tequilensis* strains CSGAB0139 isolated from spoilt cottage cheese. **Int J Appl Biol Pharma Tech**, v 5, p 201-221, 2014.

BHATTI, A. A.; HAQ, S.; BHAT, R. A. Actinomycetes benefaction role in soil and plant health. **Microbial Pathogenesis**, v.111, p.458-467, 2017.

BLASCHKE AJ, BENDER J, BYINGTON CL, KORGENSKI K, DALY J, PETTI CA, Gordonia species: emerging pathogens in pediatric patients that are identified by 16S ribosomal RNA. **Gene sequencing**, v.6, 2007.

BOOMINADHAN U, RAJKUMAR R, SIVAKUMAAR PKV, JOE MM. Optimization of protease enzyme production using *Bacillus* Sp. isolated from different wastes. **Bot Res Int**, v 2, p 83-87, 2009.

COELHO, L.V.A., BORBA, C. B. A., MELO, E. J. V., SILVA L. A. O, The streptomycetes potential in isolated from maues region in hydrolytic enzymes production, **Ciência e natura, Santa Maria**, n.2, v.39, p.202-210, 2017.

DEMAIN, A.L. Metabolic regulation of fermentation processes. **Enzyme Microb. Technol.**,v.31, p.895-906, 2008.

DENG L, WANG Z, YANG S, SONG J, QUE F, ZHANG H, FENG F. Improvement of functional properties of wheat gluten using acid protease from *Aspergillus usamii*. **PLoS ONE**, 2016.

DHAMODHARAN DURAIKANNU, SUBATHRA DEVI, CHANDRASEKARAN., Optimization and modeling studies on the production of a new fibrinolytic protease using *Streptomyces radiopugnans_VITSD8*, **Germany, part of Springer Nature, 2017**.

FREITAS ADS, SAMPAIO EVSB, FERNANDES AR, SANTOS CERS. Biological nitrogen fixation in legume trees of the Brazilian Caatinga. **J Ari Environ**. v.3, 2010

.

GODFREY T, WEST S, editors. Industrial enzymology. London, **UK: MacMillan Press**, p.226-64, 1996..

JOSHI S, SATYANARAYANA T, Biotechnology of cold-active proteases. **Biology** v.2, p.755783, 2015.

KUMAR CG, TAKAGI H., Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnol Adv**, v17, p.561-594,1997.

LAKSHMI BKM, RATNASRI PV, AMBIKADEVI K, HEMALATHA KPJ. Screening, optimization of production and partial characterization of alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **J Res Eng Technol**, v 3; p. 435- 443, 2014.

LÓPEZ-OTÍN C, BOND JS. Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease. **J. Biol.**

Chem., 283, 2008.

MORO, M. F.; NIC-LUGHADHA, E.; FILER, D. L.; DE ARAÚJO, F. S.; Martins, F. R. “A catalogue of the vascular plants of the Caatinga Phytogeographical domain: a synthesis of floristic and phytosociological surveys”. **Phytotaxa**, v. 160, p.1-118, 2014.

PENNINGTON, R. T.; LAVIN, M.; OLIVEIRA-FILHO, A. T. Woody plant diversity, evolution and ecology in the tropics: perspectives from seasonally dry tropical forests. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.**, v. 40, p.437-457, 2009.

QUEIROZ, L. P., CARDOSO, D., FERNANDES, M.,MORO, M. “Diversity and evolution of flowering plants of the Caatinga domain”. In: da Silva, J. C.; Leal, I.; Tabarelli, M, (eds.), Caatinga: the largest tropical dry forest region in South.America. **Cham: Springer**, p. 23-63, 2017.

RAHAMAT-LANGENDOEN JC, VAN MEURS M, ZIJLSTRA JG, LO-TEN-FOE JR. Disseminated Rhodococcus equi infection in a kidney transplant patient without initial pulmonary involvement. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.30, 2009.

RAMANAN P, DEZIEL PJ, WENGENACK NL. Gordonia bacteremia. **J Clin Microbiol**, v.3, 2013.

SATHYA A, VIJAYA BHARATHI R, GOPALAKRISHNAN S, Plant actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. **3 biotech**, p 7102, 2017.

SHABBIRI K, ADNAN A, JAMIL S, AHMAD W, NOOR B, RAFIQUE H M, Medium optimization of protease production by *Brevibacterium linens* DSM 20158, **Braz J Microbiol**, 43 v.3, 1051–1061, 2012.

SILVA, G.M.M.; BEZERRA, R.P.; TEIXEIRA, J.A Screening, production and biochemical characterization of a new fibrinolytic enzyme produced by *Streptomyces* sp.

(Streptomycetaceae) isolated from Amazonian lichens. **Acta Amaz.**, v.46, p.301-310, 2016.

SUMANTHA, A., DEEPA, P., SANDHYA, C., SZAKACS, G., SOCCOL, C. R., AND PANDEY, Rice bran as a substrate for proteolytic enzyme production. **Braz Arch Biotechnol.** V 49, 2006.

TEIXEIRA FCP, BORGES WL, XAVIER GR, RUMJANEK NG. Characterization of indigenous rhizobia from caatinga. **Braz J Microbiol**, p 201-208, 2010.

TYC, O. SONG, C; DICKSCHAT, J.S.; VOS, M.; GARBEVA, P. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. **Trends in Microbiology**, v.25, n.4, p. 280-292, 2016.

VELOORVALAPPIL, N. J., ROBINSON, B. S., SELVANESAN, P., SASIDHARAN, S., KIZHAKKEPAWOTHAIL, N. U., SREEDHARAN, S., PRAKASAN, P., MOOLAKKARIYIL, S. J., AND SAILAS, B., **Versatility of microbial proteases. Adv Enzyme Re.**, v.3, p 39-51, 2013.

ZAMBARE VP, NILEGAONKAR SS, KANEKAR PP, Production of an alkaline protease by *Bacillus cereus* MCM B-326 and its application as a dehairing agent. **World J. Microbiol.Biotechnol.**, 23, 2015.