

Production, purification, and characterization of protease from *Aspergillus japonicus*, grown in Solid-State Fermentation (SSF) with soybean meal.

Micael Garcia de Oliveira¹, Juliana Silva Carneiro Fonseca¹, Jean Pierre Rocha Mendes¹, Isabela Cristina Fidelis¹, Analice Martins Duarte¹.

¹ Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

* Corresponding author. E-mail: micael.oliveira@ufo.br

The *Aspergillus* fungi is known for its ability to produce a diverse range of enzymes, including protease. Solid-state fermentation (SSF) is a particularly useful technique for the growth of filamentous fungi such as *Aspergillus japonicus*. This study aimed to investigate the potential of soybeans as a substrate to promote protease production by *A. japonicus* in SSF.

A colorimetric assay was conducted using azocasein as a substrate to measure proteolytic activity. The results revealed that the highest activity was observed after 6 days of fermentation, with a value of 120 U/mL. The purified enzyme exhibited maximum activity at 40°C and pH 9, with an activity of 0.52 U/mL. Enzyme stability was tested over a range of pH and temperature values, and it was found to be stable within the pH range of 7 to 9 and the temperature range of 40 to 60°C.

The enzyme was identified as an alkaline protease with a molecular weight of 35 kDa. Effect tests were performed involving ions and detergents, which revealed that Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, SDS, and EDTA had a negative impact on proteolytic activity. These substances can interact with proteins, leading to denaturation and loss of enzymatic activity.

The outcomes of this study suggest that SSF is a promising technique for producing protease by *A. japonicus*. The purified enzyme functions best under alkaline conditions, which is typical for filamentous fungi. Enzyme stability was also favorable, observed within the pH range of 7 to 9 and temperature range of 40 to 60°C.

The ion and detergent effect tests showed that Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, SDS, and EDTA negatively impacted proteolytic activity. These substances can interact with proteins, leading to denaturation and loss of enzymatic activity. These results have the potential to facilitate the development of biotechnological processes for producing protease by *A. japonicus*.

In conclusion, this study highlights the potential of soybeans as a substrate for protease production by *A. japonicus* in SSF. The purified enzyme exhibited favorable properties in terms of activity and stability, making it a promising candidate for biotechnological applications. Overall, this study contributes to our understanding of the potential of *A. japonicus* as a source of protease and the biotechnological applications of this enzyme.

Key words: *Aspergillus japonicus*, Protease production, Solid-state fermentation, Enzyme stability

Produção, purificação e caracterização de protease de *Aspergillus japonicus*, crescido em Fermentação em Estado Sólido (FES) com farelo de soja.

O fungo *Aspergillus* é conhecido por sua capacidade de produzir uma ampla variedade de enzimas, incluindo proteases. A fermentação em estado sólido (FES) é uma técnica particularmente útil para o crescimento de fungos filamentosos, como o *Aspergillus japonicus*. Este estudo teve como objetivo investigar o potencial da soja como substrato para promover a produção de proteases por *A. japonicus* na FES.

Para medir a atividade proteolítica, foi realizado um ensaio colorimétrico usando a azocaseína como substrato. Os resultados revelaram que a maior atividade foi observada após 6 dias de fermentação, com um valor de 120 U/mL. A enzima purificada apresentou atividade máxima a 40°C e pH 9, com uma atividade de 0,52 U/mL. A estabilidade da enzima foi testada em uma faixa de valores de pH e temperatura e foi encontrada como estável na faixa de pH de 7 a 9 e na faixa de temperatura de 40 a 60°C.

A enzima foi identificada como uma protease alcalina com peso molecular de 35 kDa. Foram realizados testes de efeito envolvendo íons e detergentes, que revelaram que Zn²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, SDS e EDTA tiveram um impacto negativo na atividade proteolítica. Essas substâncias podem interagir com proteínas, levando à desnaturação e perda de atividade enzimática.

Os resultados deste estudo sugerem que a FES é uma técnica promissora para a produção de proteases por *A. japonicus*. A enzima purificada funciona melhor em condições alcalinas, o que é típico para fungos filamentosos. A estabilidade da enzima também foi favorável, observada na faixa de pH de 7 a 9 e na faixa de temperatura de 40 a 60°C.

Os testes de efeito de íons e detergentes mostraram que Zn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , SDS e EDTA afetaram negativamente a atividade proteolítica. Essas substâncias podem interagir com proteínas, levando à desnaturação e perda de atividade enzimática. Esses resultados têm o potencial de facilitar o desenvolvimento de processos biotecnológicos para a produção de proteases por *A. japonicus*.

Em conclusão, este estudo destaca o potencial da soja como substrato para a produção de proteases por *A. japonicus* na FES. A enzima purificada apresentou propriedades favoráveis em termos de atividade e estabilidade, tornando-a um candidato promissor para aplicações biotecnológicas. No geral, este estudo contribui para nossa compreensão do potencial de *A. japonicus* como fonte de proteases e das aplicações biotecnológicas dessa enzima.

Palavras-chave: *Aspergillus Japonicus*, Produção de protease, Fermentação estado sólido, estabilidade enzimática.

Acknowledge: (optional) This work was developed having support from institution XYZ.