

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS SOCIAIS, SAÚDE E TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

LUDIMILA ARAÚJO DA SILVA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA A PARTIR
DE SUBSTRATOS DO COCO BABAÇU (*Orbignya speciosa*)

IMPERATRIZ

2017

LUDIMILA ARAÚJO DA SILVA

**PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA A PARTIR
DE SUBSTRATOS DO COCO BABAÇU (*Orbignya speciosa*)**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro de Ciências Sociais, Saúde e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas

IMPERATRIZ

2017

LUDMILA ARAÚJO DA SILVA

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA A PARTIR DE
SUBSTRATOS DO COCO BABAÇU (*Orbignya speciosa*)

Aprovado em 24/07/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Adriana Crispim de Freitas (Orientadora)

Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^a Maria Alves Fontenele

Universidade Federal do Maranhão

Prof.^a Dr.^o Alan Bezerra Ribeiro

Universidade Federal do Maranhão

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Araújo da Silva, Ludimila.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA A PARTIR
DE SUBSTRATOS DO COCO BABAÇU *Orbignya speciosa* / Ludimila Araújo da
Silva. - 2017.

26 p.

Orientador(a): Adriana Crispim de Freitas.

Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão,
Universidade Federal do Maranhão, 2017.

1. *Aspergillus Oryzae*. 2. Estabilidade Térmica. 3. Fermentação Sólida. I. Crispim de Freitas, Adriana. II. Título.

Aos meus avós, Francisco e Maria do Socorro (*in memoriam*) que sempre acreditaram e investiram tudo o que tinham para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente e principalmente, a Deus. A Ele toda honra e glória em todo o tempo;

A minha querida orientadora, Adriana Crispim, que desde o início desta caminhada tem me ensinado a ser uma pessoa melhor em todos os sentidos, toda a minha admiração e amor por você;

A toda a minha família, em especial minha mãe Euzita Araújo, que sempre batalhou para que eu pudesse ter a oportunidade de uma vida melhor. Mãe, essa vitória é sua;

Ao meu amado noivo, Thiago Lodi, pelo apoio, incentivo e ajuda sem fim, você tornou o caminho até aqui mais fácil;

Aos meus companheiros de laboratório Andresa Sousa, Francielle Oliveira, Raiane Vieira, Gustavo Saraiva, Cristian Neres e Thalyne Mariane muito obrigada por todos os momentos e aprendizados vividos;

Ao meu irmão científico mais velho, Iago Hudson, por ter me ensinado tudo o que sabia e por todos os segredos e perrengues que não sairão dos laboratórios da UFMA;

As amigas que a UFMA me deu, Angélica Oliveira e Catarina Mesquita, por todas as vezes que juntas rimos dos nossos próprios problemas e assim, tudo se tornou mais fácil;

Ao meu amigo de longa data, Renato Pablo, que sempre acreditou mais em mim do que eu mesma;

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte deste período de minha vida, muito obrigada!

RESUMO

A fermentação em estado sólido é uma ferramenta considerada importante na obtenção de enzimas de origem microbiana. As proteases são consideradas uma classe de grande importância para o ramo industrial devido sua ampla aplicabilidade em diversos setores. O fungo filamentoso *Aspergillus oryzae* possui destaque na produção enzimática por sua capacidade de produzir proteases ácidas, neutras e alcalinas. Este trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de proteases de *A. oryzae* CCBP001 a partir de subprodutos do babaçu (*Orbignya speciosa*). A protease alcalina produzida neste trabalho foi obtida a partir de condições otimizadas de meio (50% de umidade, 5% de fibra da casca do babaçu e 45% de torta do babaçu) em 96 horas de fermentação, apresentando atividade proteolítica máxima em pH 8,0 à 45°C. Após o processo de purificação parcial da enzima em sulfato de amônio, a fração proteica apresentou-se estável na faixa de pH 5,0 a 8,0 em 30 e 40°C. A produção enzimática a partir de subprodutos regionais apresenta vários benefícios, entre eles a vasta disponibilidade de matéria prima e o baixo custo agregado ao processo. Além disso, a estabilidade em uma ampla faixa de pH apresentada pela enzima estudada sugere possíveis aplicações industriais da mesma em diversos ramos, como o de alimentos e de detergentes.

Palavra-chaves: Fermentação sólida; *Aspergillus oryzae*; Proteases; Subprodutos Agroindustriais; Estabilidade Enzimática.

ABSTRACT

Solid state fermentation is a tool considered important in obtaining enzymes of microbial origin. The proteases are considered a class of great importance for the industrial branch due to its wide applicability in several sectors. The filamentous fungus *Aspergillus oryzae* is prominent in enzymatic production due to its ability to produce acid, neutral and alkaline proteases. This work aims at the production and characterization of *A. oryzae* CCBP001 proteases from by-products of babassu (*Orbignya speciosa*). The alkaline protease produced in this work was obtained from optimized conditions of medium (50% moisture, 5% babaçu bark fiber and 45% babassu pie) in 96 hours of fermentation, presenting maximum proteolytic activity at pH 8,0 to 45 ° C. After the partial purification of the enzyme in ammonium sulfate, the protein fraction was stable in the range of pH 5.0 to 8.0 at 30 and 40°C. The enzymatic production from regional by-products presents several benefits, among them the wide availability of raw material and the low added cost to the process. In addition, the stability over a wide range of pH presented by the enzyme studied suggests possible industrial applications of the same in several branches, such as food and detergent.

Key-words: Solid fermentation; *Aspergillus oryzae*; Proteases; Agroindustrial By products; Stability Enzymetic.

SUMÁRIO

Introdução	7
Materiais e Métodos	8
Microorganismo	8
Matéria prima	8
Seleção do substrato e formulação do meio de fermentação	8
Atividade enzimática	9
Caracterização enzimática	9
Purificação parcial da enzima em sulfato de amônia	9
Estabilidade da enzima	9
Resultados e Discussão	9
Caracterização da composição centesimal dos substratos	9
Delineamento de misturas tipo Simplex-Lattice	10
Delineamento composto rotacional central	11
Caracterização enzimática	12
Estabilidade enzimática	13
Conclusão	15
Referências	16
Anexos	18

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE ALCALINA A PARTIR DE SUBSTRATOS DO COCO BABAÇU (*Orbignya speciosa*)

Ludimila Araújo da SILVA¹; Adriana Crispim de FREITAS²

¹ Estudante do curso de Engenharia de Alimentos; Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão – CCSST, Imperatriz – Maranhão, Brasil; email: ludimilaaraujo.s@hotmail.com.

² Profa. Dra. do curso de Engenharia de Alimentos; Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Maranhão – CCSST, , Imperatriz – Maranhão, Brasil; email: adrianacrispim@gmail.com.

RESUMO

A fermentação em estado sólido é uma ferramenta considerada importante na obtenção de enzimas de origem microbiana. As proteases são consideradas uma classe de grande importância para o ramo industrial devido sua ampla aplicabilidade em diversos setores. O fungo filamentosso *Aspergillus oryzae* possui destaque na produção enzimática por sua capacidade de produzir proteases ácidas, neutras e alcalinas. Este trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de proteases de *A. oryzae* CCBP001 a partir de subprodutos do babaçu (*Orbignya speciosa*). A protease alcalina produzida neste trabalho foi obtida a partir de condições otimizadas de meio (50% de umidade, 5% de fibra da casca do babaçu e 45% de torta do babaçu) em 96 horas de fermentação, apresentando atividade proteolítica máxima em pH 8,0 à 45°C. Após o processo de purificação parcial da enzima em sulfato de amônio, a fração proteica apresentou-se estável na faixa de pH 5,0 a 8,0 em 30 e 40°C. A produção enzimática a partir de subprodutos regionais apresenta vários benefícios, entre eles a vasta disponibilidade de matéria prima e o baixo custo agregado ao processo. Além disso, a estabilidade em uma ampla faixa de pH apresentada pela enzima estudada sugere possíveis aplicações industriais da mesma em diversos ramos, como o de alimentos e de detergentes.

Palavra-chaves: Fermentação sólida; *Aspergillus oryzae*; Proteases; Subprodutos Agroindustriais; Estabilidade Enzimática.

INTRODUÇÃO

As enzimas industriais representam cerca de 57% do mercado global de vendas, com expectativa de crescimento significativo nos próximos anos, dada a crescente demanda de aplicações em diversos ramos industriais. Em 2015, o mercado global de vendas de enzimas faturou US\$ 8,18 bilhões [1]. Entre as classes enzimáticas existentes as proteases são consideradas uma das mais importantes. Além de constituir dois terços do total de enzimas vendidas mundialmente, possuem ampla aplicação em processos nas indústrias de detergentes, fármacos, alimentos, têxtil e outras [2].

As enzimas proteolíticas são responsáveis por catalisar a hidrólise de proteínas por meio da clivagem de ligações peptídicas. Além disso, apresentam múltiplos mecanismos de ação e diversidade estrutural o que justifica sua ampla aplicabilidade industrial. As proteases podem ser produzidas por animais, plantas e microrganismos. Atualmente a produção de proteases de origem vegetal e animal não suprem as necessidades industriais existentes devido a questões sazonais e geográficas, assim como questões públicas como a demanda de animais para abate. Portanto, existe um grande interesse acerca das proteases de origem microbiana. Estas são consideradas fontes atrativas para produção de metabolitos por seu baixo custo, tempo relativamente curto de produção, possibilidade de cultivo em grandes quantidades e atuação em substratos específicos, apresentam maior estabilidade e com aplicação em diversos ramos da biotecnologia e bioquímica [3, 4].

A fermentação em estado sólido (FES) é uma ferramenta importante na obtenção de enzimas de origem microbiana. O processo fermentativo ocorre com o crescimento do microrganismo no interior ou superfície do substrato sólido ausente de água livre aparente. A FES é uma técnica que possui diversas características

vantajosas, sendo a principal característica a utilização de baixa atividade de água nos substratos tornando o ambiente de crescimento de microrganismos muito semelhante ao habitat natural, sendo um processo considerado vantajoso para o crescimento de fungos filamentosos. Ademais, proporciona maior facilidade de obtenção de esporos, maior estabilidade das enzimas a mudanças de temperatura e pH e maior produtividade de extratos enzimáticos, quando comparada a outras técnicas [5]. Outra particularidade desta metodologia é a possibilidade de utilização de subprodutos agroindustriais como substratos fermentativos, servindo como fonte de energia e carbono para produção de substâncias de alto valor agregado[6].

O *Aspergillus oryzae* é um fungo filamentoso muito utilizado no setor industrial por sua capacidade de excreção de grande variedade de enzimas, como proteases e amilases. Na literatura é citado por sua capacidade de secretar grande número de proteínas quando crescido em FES, além de sua vasta aplicação em processos fermentativos, como agente de fermentação, utilizando subprodutos agroindustriais como matéria prima [6 - 10].

A literatura apresenta uma variedade de trabalhos que empregam subprodutos agroindustriais como substratos na FES [11 - 15]. A escolha de um substrato sólido é considerada um fator crítico para o aumento da produtividade enzimática. No Brasil, subprodutos agroindustriais são matéria prima abundantes devido à grande produção industrial, de baixo custo e, em alguns casos, sem valor agregado sendo comumente descartado [5, 11].

Portanto, este trabalho tem como objetivo a produção e caracterização de proteases de *A. oryzae* CCBP001 a partir de subprodutos do babaçu (*Orbignya speciosa*).

MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem do fungo filamentoso utilizada neste trabalho foi a *Aspergillus oryzae* CCBP001, pertencente a coleção da Embrapa Agroindústria Tropical. Os esporos do *A. oryzae*, estocados a -18 °C em solo estéril, foram reativados em três etapas conforme a metodologia descrita por Freitas [6]. A concentração do inóculo utilizada foi de 10⁷ esporos/g de meio.

Matéria prima

Os subprodutos utilizados como substratos foram o mesocarpo, endocarpo, torta do babaçu e fibra da casca provenientes da extração do coco babaçu. O mesocarpo e a torta do babaçu foram obtidos na Associação de Quebradeiras de Coco da cidade de Cidelândia, Maranhão, Brasil. O endocarpo e a fibra da casca foram cedidos pela indústria Tobasa Bioindustrial de Babaçu localizada na cidade de Tocantinópolis, Tocantins, Brasil. Para obtenção do meio de fermentação a torta do babaçu e a fibra passaram por tratamento adicional. A torta foi seca em estufa a 40°C por 16 horas. A fibra ficou imersa em água por 4 dias, sendo realizada sucessivas trocas de água neste período, e seca em estufa a 60°C por 6 horas.

As determinações de proteínas, lipídios, umidade, atividade de água, cinzas e carboidratos totais foram realizadas para o mesocarpo, endocarpo e torta do babaçu de acordo com as metodologias do Instituto Adolfo Lutz [16].

Seleção do substrato e formulação do meio de fermentação

Foi realizado um estudo de formulação do meio de fermentação e cinética de produção enzimática proteolítica, através de delineamento experimental de mistura tipo Simplex Lattice, visando a obtenção de maior atividade proteolítica. A formulação foi composta por meios individuais e misturas binárias e ternárias dos substratos mesocarpo, endocarpo e torta do babaçu nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas, totalizando 40 ensaios. Após a análise dos resultados um delineamento composto central foi realizado. Neste, foram avaliadas a resposta da adição da fibra da casca e a umidade do meio na atividade proteolítica resultante, totalizando 11 ensaios. Em ambos os casos, a extração dos extratos enzimáticos foi obtida a partir da adição de água, seguida de incubação a 30°C por 1 hora e filtrado em papel filtro qualitativo. Após a definição das condições otimizadas de meio, umidade e tempo de fermentação a partir dos delineamentos experimentais novos ensaios de FES foram realizados.

Atividade enzimática

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Freitas [6].

Caracterização enzimática

Para a determinação do pH ótimo de extração dos extratos enzimáticos obtidos pela FES foram realizadas análises utilizando soluções tampões em diferentes faixas de pH para extração da enzima. Os pH 5 e 6 foi utilizado tampão acetato, para a faixa de 7 a 8 utilizou-se o tampão fosfato e 9 a 10 tampão borato. Cada solução tampão foi adicionado há um meio após a fermentação, homogeneizada e acondicionado em estufa microbiológica a 30°C por 1 hora. Posteriormente, o extrato enzimático obtido foi filtrado e armazenado a -8°C.

Para a investigação da temperatura ótima de determinação o extrato enzimático, obtido com o pH ótimo de extração, foi submetido a determinação da atividade proteolítica de acordo com Freitas [6], variando as temperaturas de determinação entre 30 e 60°C.

Purificação parcial da enzima em sulfato de amônia

A precipitação do extrato enzimático obtido foi adaptada a partir da metodologia descrita por Bracht e Ishii-Iwamoto [17]. As concentrações de saturação de sulfato de amônio utilizadas foram 40, 60 e 80%, de acordo com Freitas [6], sendo a adição realizada com agitação branda e em banho de gelo. Após a solubilização as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante removido. Posteriormente, as amostras de cada tratamento, foram submetidas a dessalinização por diálise em membrana de celulose de 33 mm, por 24 h a 25°C. Após o processo de diálise as frações proteicas foram liofilizadas. A fração liofilizada obtida a partir da concentração de 80% de saturação foi utilizada nas análises de estabilidade em pH e temperatura e na identificação das enzimas produzidas.

Estabilidade da enzima

A fração liofilizada foi submetida ao estudo da estabilidade da enzima em diferentes faixas de pH (4,0 – 10,0) e temperaturas (30°C – 70°C). Para o estudo da estabilidade em pH, a fração diluída (0,001:10 m/v) foi adicionada a solução tampão (1:50 v/v) e agitada em Shaker orbital durante duas horas a 30°C. Sendo retirada alíquotas de cada frasco, ao final da análise, para determinação da atividade residual.

Para a análise da estabilidade em diferentes temperaturas a fração proteica, diluída em tampão ótimo (0,001:10 m/v), foi exposta as temperaturas 30, 40, 45, 50, 60 e 70 °C por 90 minutos. Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos.

Em ambas as análises, após os processos a atividade enzimática residual foi determinada nas condições ótimas de pH e temperatura, estabelecidas neste trabalho, de acordo com a metodologia descrita por Freitas [6].

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização da composição centesimal dos substratos

A Tabela 1 apresenta os resultados da composição centesimal dos subprodutos mesocarpo, endocarpo e torta do babaçu. O mesocarpo e endocarpo obtiveram altos valores de carboidratos totais (83,74 e 81,43%) e teores de umidade (13,16 e 11,14%) e atividade de água semelhantes quando comparados aos da torta do babaçu. O teor de lipídios e proteínas da torta foram superiores aos valores estabelecidos aos demais substratos. Os resultados obtidos para o mesocarpo são análogos aos apresentados por Silva [18] em seu trabalho de caracterização do mesocarpo proveniente do Piauí. A composição centesimal da torta do babaçu corrobora com os valores estabelecidos pelo Dossiê Técnico de Cultivo e Extração do Óleo [19], com exceção aos teores de umidade e lipídios que ultrapassaram o valor máximo estabelecido de 12%, para ambos.

Tabela 1 Caracterização da composição centesimal do mesocarpo, endocarpo e torta do babaçu

	Mesocarpo	Endocarpo	Torta do Babaçu
Atividade de água	0,68	0,59	0,99*
Umidade	13,16%	11,14%	62,68%*
Proteínas	0,35%	0,69%	2%
Cinzas	1,11%	4,24%	1,44%
Lipídios	1,67%	2,5%	17,77%
Carboidratos Totais	83,74%	81,43%	16,56%

* Matéria prima antes do processo de secagem.

Fonte: Autores, 2017.

Delineamento de misturas tipo Simplex-Lattice

A escolha do substrato sólido é de extrema importância para o processo fermentativo, uma vez que ele deve fornecer os nutrientes necessários ao desenvolvimento do microrganismo. Portanto, a partir do delineamento experimental de misturas foi possível observar preliminarmente o meio em que houve a maior atividade proteolítica e a avaliação das matérias-primas em diferentes proporções na formulação e interação através de mistura binária e ternária durante o estudo cinético da produção enzimática. A Tabela 2 apresenta os valores referentes a composição do meio e os resultados de atividade proteolítica obtidos para cada ensaio.

Tabela 2 Delineamento experimental de misturas tipo Simplex-Lattice e suas respectivas respostas nos tempos fermentativos, sendo A: mesocarpo, B: endocarpo e C: torta do babaçu

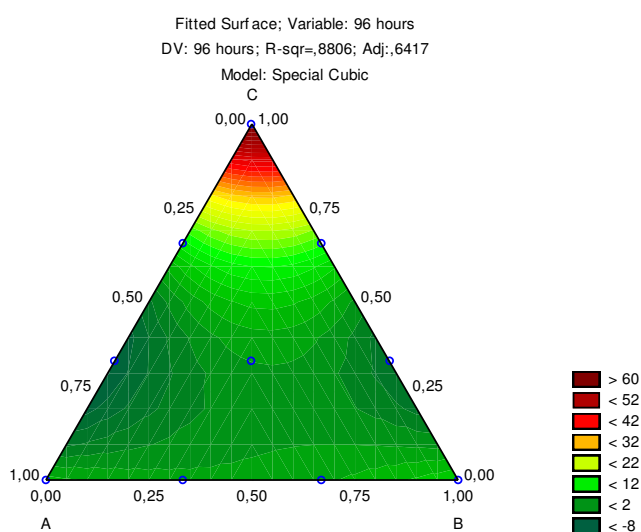
Ensaio	A	B	C	24h	48h	72h	96h
1	100%	0%	0%	3,5	1,5625	0,15625	1,96875
2	0%	100%	0%	4,75	2,875	9,375	4,15625
3	0%	0%	100%	35,9375	36,09375	53,46875	68,9375
4	33%	67%	0%	2,3125	1,6875	1,96875	4,5625
5	33%	0%	67%	4,4375	5,28125	0,90625	1,625
6	0%	33%	67%	8,375	7,0625	2,0625	3,8125
7	67%	33%	0%	5	3,71875	2	1,625
8	67%	0%	33%	10,1875	2,9375	1,71875	1,46875
9	0%	67%	33%	21,0625	2,3125	4,15625	6,6875
10	33%	33%	33%	3,5	1,28125	2,09375	1,875

Fonte: Autores, 2017.

Os ensaios individuais de torta do babaçu exibiram maior atividade proteolítica, quando comparado aos outros ensaios. O resultado de 96 horas de fermentação foi estatisticamente significativo a um nível de 95% de confiança, com $r^2 = 0,88$ e modelo cúbico especial representado pela Equação 1. Os ensaios 8 e 9, compostos por misturas binárias, em 24 horas de fermentação apresentaram maiores valores de atividades, comparados aos demais, porém não significativos estatisticamente. A Fig 1 apresenta a superfície de resposta ternária resultante ao modelo aplicado e ilustra o efeito dos substratos avaliados sobre a atividade proteolítica. É possível observar que o estudo dos substratos para o meio fermentativo foi decisivo para a escolha do meio em que a produção de protease resulta em maiores valores de atividade enzimática. Sendo a torta do babaçu a mais eficiente, neste sentido, para este processo.

$$\text{Atividade enzimática} = 4,82*x_1 + 7,97*x_2 + 62,27*x_3 - 14,85*x_1*x_2 - 144,00*x_1*x_3 - 134,42*x_2*x_3 + 254,88*x_1*x_2*x_3 \quad (\text{Equação 1}).$$

Figura 1 Superfície de resposta ternária de mistura sendo A: mesocarpo, B: endocarpo e C: torta do babaçu



Fonte: Autores, 2017.

Delineamento composto rotacional central

O delineamento composto rotacional central investigou a otimização da formulação do meio fermentativo com o objetivo de elevar a atividade proteolítica com variação da umidade inicial do meio de fermentação e adição da fibra do coco babaçu. Um vez que um problema recorrente na FES é a utilização incompleta de nutrientes devido à baixa transferência de oxigênio no substrato [8], logo para que houvesse o aumento da transferência de oxigênio a fibra do coco babaçu foi adicionada ao meio. A Tabela 3 apresenta a resposta da atividade proteolítica ao delineamento estudado, em 96 horas de fermentação. Com exceção ao ensaio 5, os demais ensaios apresentaram altos valores de atividades.

Tabela 3 Delineamento composto central e sua respectiva resposta em 96 horas de fermentação

Ensaio	Umidade (%)	Fibra (%)	A. proteolítica (U/g)
1	-1,00000	-1,00000	89
2	-1,00000	1,00000	87,875
3	1,00000	-1,00000	109,5
4	1,00000	1,00000	95,6875
5	-1,41421	0,00000	48,4375
6	1,41421	0,00000	94,1875
7	0,00000	-1,41421	75,875
8	0,00000	1,41421	78,875
9	0,00000	0,00000	91,6875

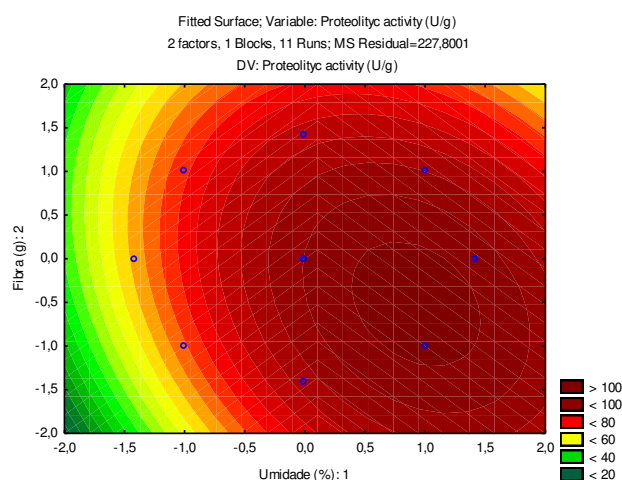
Fonte: Autores, 2017.

A partir dos resultados da análise estatística dos dados foram considerados significativos apenas os parâmetros com p-valor menores que 10% ($p < 0,1$), sendo apenas o termo linear da umidade significativo para a produção enzimática ($p\text{-valor} = 0,08$ e $r^2=0,56$) com modelo linear representado pela Equação 2.

A figura 2 apresenta a superfície de resposta do delineamento experimental estudado. A superfície evidencia o efeito positivo da umidade relacionado ao aumento da atividade enzimática. Para este estudo, o ensaio 3 foi definido como a formulação de meio otimizada sendo constituída por 50% de umidade, 5% de fibra e 45% de torta do babaçu sendo o tempo de fermentação de 96 horas.

$$\text{Atividade enzimática} = 96,23 + 11,63 * x - 7,16 * x^2 - 1,34 * y - 4,13 * y^2 - 3,17 * x * y \quad (\text{Equação 2}).$$

Figura 2 Superfície de resposta do delineamento do composto central

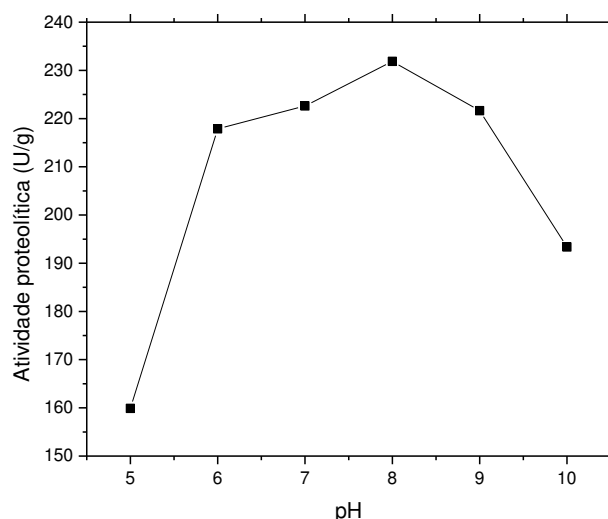


Fonte: Autores, 2017.

Caracterização enzimática

A identificação das condições favoráveis de extração enzimática, além de otimizar o processo de produção, é de extrema importância para a determinação das propriedades e aplicações da enzima [6]. A figura 3 apresenta a análise do pH ótimo de extração do extrato enzimático obtido a partir das condições otimizadas no meio. Foram obtidas boas recuperações enzimáticas nas faixas de pH de 6,0 – 9,0, sendo a maior recuperação (231,875 U/g) alcançada no tampão fosfato de sódio de pH 8,0. Os pH 5,0 e 10, pontos extremos deste estudo, apresentaram 68 e 83% da atividade proteolítica residual, respectivamente. A maior recuperação em pH 8,0 indica que a protease produzida neste trabalho é uma protease alcalina. Tunga, Shrivastava e Banerjee [20] em seu trabalho também produziram protease alcalina de *Aspergillus parasiticus*, em farelo de trigo, sendo o pH 8,0 ótimo para extração enzimática.

Figura 3 Análise do pH ótimo de extração do extrato enzimático



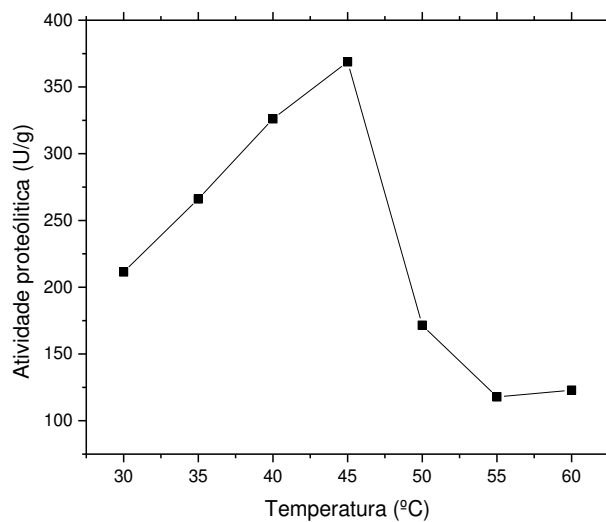
Fonte: Autores, 2017.

O estudo da temperatura ótima da determinação da atividade proteolítica foi avaliado. O efeito da temperatura na atividade da protease foi estudado no pH 8,0. A atividade enzimática foi crescente na faixa

de temperatura entre 30 a 45 °C, onde nesta temperatura ocorreu a máxima atividade proteolítica (368,8125 U/g) (figura 4). Em temperaturas superiores a 45 °C houve um decréscimo na atividade enzimática, indicando o ponto da desnaturação proteica.

Chutmanop *et al.* [8] explana em seu trabalho que a temperatura é um fator crítico para a obtenção de valores máximos de atividade enzimática enquanto que o ramo industrial possui interesse em enzimas industriais que sejam ativas e estáveis em temperaturas mais elevadas. Em seu trabalho, os autores avaliaram a protease de *A. oryzae*, produzida por FES em farelo de arroz, que também apresentou máxima atividade proteolítica a 45°C.

Figura 4 Análise da temperatura ótima de determinação do extrato enzimático



Fonte: Autores, 2017.

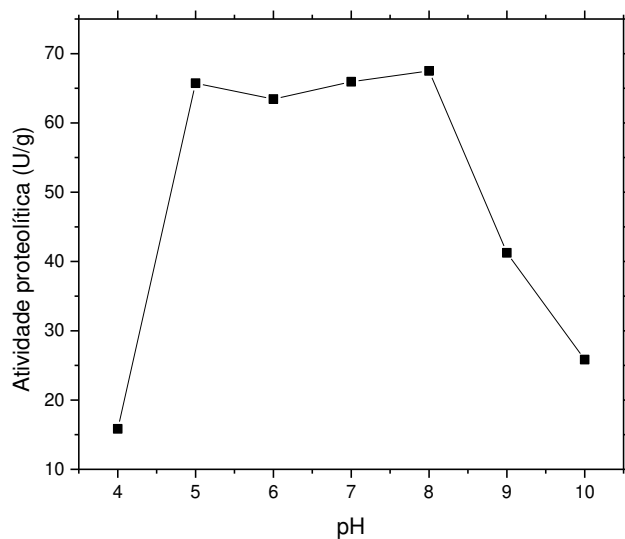
Estabilidade enzimática

A figura 5 apresenta a estabilidade da enzima purificada e liofilizada quando incubada em diferentes valores de pH por duas horas. Foi possível observar que a enzima se mostrou estável na faixa entre pH 5,0 e 8,0, apresentando 97 e 100%, respectivamente, da atividade enzimática residual, sendo em pH 8,0 o maior valor obtido. Em pH 6,0 exibiu um leve decaimento da atividade proteolítica residual, com relação ao valor obtido em pH 5,0, apresentando 94% do valor de atividade. Em pH 4,0, 9,0 e 10,0 a enzima apresentou 23, 61 e 38% de atividade residual, respectivamente.

É importante salientar que um dos pré-requisitos para determinar a viabilidade da aplicação de uma enzima na indústria de detergentes é ser estável em uma ampla faixa de pH [21]. Assim, estudos são realizados a fim da obtenção de enzimas que possuem tal característica.

Alguns estudos utilizando o *Aspergillus* enfatizam a capacidade deste gênero de produzir proteases estáveis em uma ampla faixa de pH. Charles *et al.* [22] obtiveram protease alcalina de *Aspergillus nidulans*, estável na faixa de pH 6,0 – 10, com atividade residual máxima em pH 8,0. Tremacoldi *et al.*[23] purificaram protease alcalina de *Aspergillus clavatus* estável em variação de pH 6,0 – 11,0 e atividade residual máxima em pH 9,5.

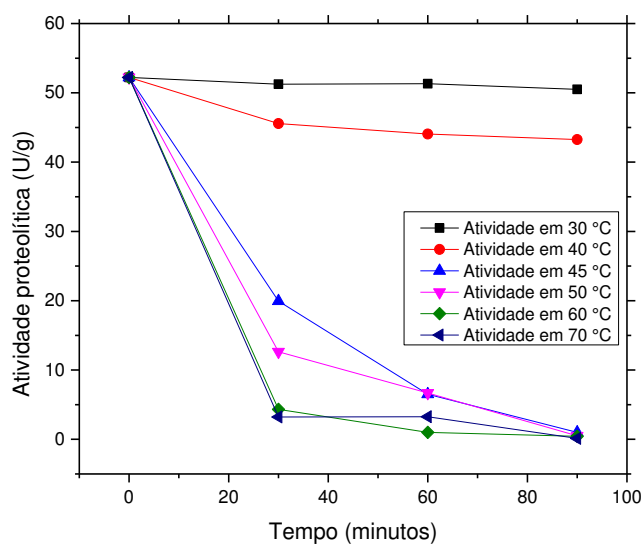
Figura 5 Estudo da estabilidade da enzima purificada em diversas faixas de pH



Fonte: Autores, 2017.

A figura 6 apresenta a estabilidade da enzima liofilizada quando incubada em diferentes temperaturas por 90 minutos. A enzima apresentou-se estável em 30°C, nas frações de tempo estudadas, exibindo 97% de atividade proteolítica residual em 90 minutos. A partir de 40°C é possível observar que, após 30 minutos de incubação, a enzima apresentou perda de atividade proteolítica. A perda de atividade ocorreu de forma gradual ao longo do tempo, apresentando em 90 minutos 87% da atividade inicial.

Figura 6 Estudo da estabilidade da enzima purificada em diferentes temperaturas



Quando exposta as demais temperaturas avaliadas (45, 50, 60 e 70°C) a enzima não expressou estabilidade térmica, apresentando uma queda brusca na atividade residual após 30 minutos de incubação. Aos 90 minutos a atividade residual para cada temperatura foi de 2, 24, 8 e 6%, respectivamente. Uma alternativa interessante para evitar a perda de atividade enzimática é o estudo do processo de encapsulamento da enzima. Silva [24] em seu trabalho conseguiu melhorar a manipulação e a estabilidade

enzimática, conservando até 91% da atividade proteolítica através da microencapsulação do extrato enzimático.

Silva [25] avaliou a estabilidade térmica (30 – 55°C) da protease de *Aspergillus fumigatus* Fresenius em até 60 minutos de exposição. Em 30, 35 e 45°C a enzima purificada manteve-se estável apresentando 90, 90 e 85%, respectivamente, de atividade enzimática residual após 60 minutos de análise. No entanto, para as temperaturas acima de 45°C o perfil da atividade residual avaliada sugeriu que a enzima possui menor estabilidade. Após 60 minutos de incubação a 50°C a atividade residual foi igual a 10%. Valores estes que corroboram com os encontrados neste trabalho.

CONCLUSÃO

Neste estudo, através do processo fermentativo em estado sólido foi possível a obtenção de protease alcalina de *Aspergillus oryzae* CCBP001, por meio da utilização dos subprodutos do coco babaçu. A enzima produzida em condições otimizadas do meio fermentativo apresentou atividade proteolítica máxima em pH 8,0 à 45°C e estabilidade em ampla faixa de pH.

O perfil apresentado pela enzima sugere que a mesma possui potencial para aplicações na indústria, apresentando vantagens quanto ao seu processo de produção a partir do baixo custo agregado aos subprodutos utilizados.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e a Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

REFERÊNCIAS

- [1] Grand View Research (2016) Enzymes market by type (industrial, specialty), by product (carbohydrases, proteases, lipases, polymerases & nucleases), by application (food & beverages, detergents, animal feed, textile, paper & pulp, nutraceutical, personal care & cosmetics, wastewater, research & biotechnology, diagnostics, biocatalyst) and segment forecasts to 2024. Publishing Grand Reserach View. <http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/enzymes-industry>. Acesses 19 July 2017.
- [2] Savitha S, Sadhasivam S, Swaminathan K, Lin FH (2011) Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 42, n. 2, p. 298-304, 2011.
- [3] Werneck GC (2016) Produção de proteases por fungos endofíticos isolados de plantas do Cerrado. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília.
- [4] Souza PM (2015) Produção de proteases por fungos filamentosos isolados do cerrado do centro-oeste brasileiro. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [5] Ractz JVB (2015) Produção e aplicação de proteases dos fungos *Aspergillus Oryzae* e *Aspergillus Niger*. Monografia de Conclusão de Curso. Faculdade de Ceilândia.
- [6] Freitas AC, Castro RJS, Fontenele MA, Egito AS, Farinas CS, Pinto GAS (2013) Canola cake as a potential substrate for proteolytic enzymes production by a selected strain of *Aspergillus oryzae*: selection of process conditions and product characterization. *ISRN microbiology*.
- [7] Freitas LS, Martins ES, Ferreira OE (2014) Produção e caracterização parcial de α -amilase de *Syncephalastrum racemosum*. *Revista Brasileira de Biociências*, v. 12, n. 4.
- [8] Chutmanop J, Chuichulcherm S, Chisti Y, Srinophakun P (2008) Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 7, p. 1012-1018.
- [9] Freitas AC (2009) Produção de proteases por *Aspergillus* em fermentação semi-sólida utilizando torta de canola. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará.
- [10] Silva GAB, Almeida WES, Cortes MS, Martins ES (2009) Produção e caracterização de protease obtida por *Gliocladium verticilloides* através da fermentação em estado sólido de subprodutos agroindustriais. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, v. 3, n. 1.
- [11] Junior JVM (2010) Estudo da produção simultânea de fitase e tanase por *Paecilomyces variotii* e detoxificação de resíduos agroindustriais para reuso em ração animal. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. 2010.
- [12] Souza RLA, Oliveira, LSC, Silva FLH, Amorim BC (2010) Caracterização da poligalacturonase produzida por fermentação semi-sólida utilizando-se resíduo do maracujá como substrato. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental-Agriambi*, v. 14, n. 9.
- [13] Paris LD, Scheufele FB, Junior AT, Guerreiro TL, Hasan SDM (2012) Produção de complexos enzimáticos por *A. niger* a partir de soja por fermentação em estado sólido. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 34, n. 2.
- [14] Silva DB, Junior CAF, Scheidt GN, Barilli J, Giongo M (2014) Estudo comparativo da atividade de celulases fúngicas induzidas por substratos de serragem de eucalipto e palha de arroz. *Evidência-Ciência e Biotecnologia*, v. 14, n. 2, p. 155.
- [15] Penha EM, Viana LAN, Gottschalk LMF, Terzi SC, Souza EF, Freiras SC, Santos JO, Salum TSC (2016) Aproveitamento de resíduos da agroindústria do óleo de dendê para a produção de lipase por *Aspergillus Níger*. *Ciência Rural*, v. 46, n. 4, p. 755-761.

- [16] Instituto Adolfo Lutz (2008) Normas Analíticas; métodos químicos e físicos para a análise de alimentos, 4 ed, São Paulo.
- [17] Bracht A, Ishii-Iwamoto EL (2003) Métodos de Laboratório em Bioquímica. Ed. Manole, São Paulo.
- [18] Silva APS (2011) Caracterização físico-química e toxicológica do pó de mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart): subsídio para o desenvolvimento de produtos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Piauí.
- [19] Carvalho JDV (2007) Dossiê Técnico: Cultivo de Babaçu e Extração do Óleo. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília – CDT/UnB.
- [20] Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R (2003) Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 11, p. 1553-1558.
- [21] Nascimento WCA, Martins MLL (2006) Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*.
- [22] Charles P, Devanathan V, Periasamy A, Ponnuswamy MN, Kalaichelvan PT, Hur B (2008) Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *Journal of basic microbiology*, v. 48, n. 5, p. 347-352.
- [23] Tremacoldi CR, Monti R, Selistre-de-Araujo HS, Carmona EC (2007) Purification and properties of an alkaline protease of *Aspergillus clavatus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 295-299.
- [24] Santos TAO (2012) Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por spray drying. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- [25] Silva RR (2011) Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ANEXOS

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS - Indian Journal of Microbiology

CATEGORIES OF MANUSCRIPTS

- Full Length (not exceeding 3500 words)

The paper should describe new and confirmed findings. Experimental procedures should give sufficient details for others to verify the work. The paper should have 10-12 typed pages comprising (a) an abstract, (b) key words, not more than 5, (c) introduction, precise to introduce the subject with citations of relevant literature, (d) material and methods, (e) results and discussion, (f) acknowledgements, and (g) references.

No heading

for abstract and introduction to be given.

- Short Communication (not exceeding 1200 words)

A short communication should be a record of completed short investigation giving details of new methods or findings. It should not exceed 4 to 5 typed pages with an abstract followed by key words. Body of the text will not have any title, like abstract, material and methods, results, and discussion except the acknowledgements and references.

- Review (not exceeding 5000 words)

It should be comprehensive, up to date and critical on a recent topic of importance. It should cite latest references and identify the gaps for future research. It should also contain an abstract (without heading), key words, acknowledgements and references.

- Correspondence (not exceeding 600 words)

This consists letters that are of general interest to scientists and technical comments, including those on articles or communications published in IJM within the previous six months. Short letters are preferred. Letters may be reviewed and edited.

- Scientific Correspondence (less than 1500 words and 2 display items).

These serve to rapidly communicate important new findings. Contributions dealing with technical advances or advances in instrumentation may be published as Technical notes.

- News and Views (not exceeding 1000 words)

News and views can cover important scientific events or any other news of interest to scientists in general.

- Meeting Reports (less than 1500 words) deal with highlights/technical contents of a conference/Symposium/discussion-meeting, etc. conveying to readers the significance of important advances. Reports must avoid listing brief accounts of topics discussed.

- Research News

Articles (not exceeding 2000 words and 3 display items) are intended to inform non-specialists about recently published advances or important findings.

- Opinion Articles (less than 1200 words)

These present views on issues related to science and scientific activity.

- Commentary (less than 2000 words)

These articles are expected to be short expository essays on issues related to science and scientific activity.

- Book Reviews (not exceeding 1500 words)

Book reviews are generally solicited / commissioned, unsolicited reviews will also be considered. Reviews must not merely 'list' brief descriptions of the contents of the book. All manuscripts are subject to the review process, and the Editor-in-Chief will make the final decision concerning acceptance or rejection, or editor/

Associate editor assigned by the Editor-in-Chief; however, the following instructions must be observed to avoid delays.

MANUSCRIPT SUBMISSION

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

THE FOLLOWING SHOULD BE PROVIDED DURING THE SUBMISSION PROCESS

- The names of four suggested referees, together with their institutions, telephone numbers and email addresses. Please add the relevant areas of expertise and indicate their suitability as referees, in brackets, after the names. Do not suggest scientists based in your own institution or close collaborators elsewhere, as they will not be approached.
- The editors will check the standing of the referees in their stated fields by reference to PubMed and other public databases.
- A covering letter of submission (giving the postal, fax, and email addresses of the corresponding author) should be inserted into the appropriate box (“comments for the Editor in-Chief”). Please add fax numbers of suggested referees in the covering letter.
- Evidence of submission of sequences to a databank.
- Approval of citation of any personal communications.
- Any unpublished papers that are cited must be uploaded for referees to access. An electronic copy of any related paper under consideration or in press elsewhere must also be submitted to facilitate evaluation

by the referees. Failure to do this may delay the review process.

- Any other supplementary material (see below)
- If the manuscript is a resubmission, please upload a letter giving point-by-point responses to the comments by the reviewers of the previous version.

TITLE PAGE

Title Page

The title page should include:

- ⌘ The name(s) of the author(s)
- ⌘ A concise and informative title
- ⌘ The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- ⌘ The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author ⌘ If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

TEXT

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- ⌘ Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text. ⌘ Use italics for emphasis.
- ⌘ Use the automatic page numbering function to number the pages. ⌘ Do not use field functions.
- ⌘ Use tab stops or other commands for indents, not the space bar. ⌘ Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- ⌘ Use the equation editor or MathType for equations.
- ⌘ Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units (SI units).

REFERENCES

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

⌘ Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

⌘ Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

⌘ Book

South J, Blass B (2001) The future of modern genomics. Blackwell, London ⌘ Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

Dissertation

Trent JW (1975) Experimental acute renal failure. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

ISSN.org LTWA

If you are unsure, please use the full journal title.

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file spbasic.bst which is included in Springer's LaTeX macro package.

Important note:

At this journal it is mandatory that the DOI is given at the end of each reference.

TABLES

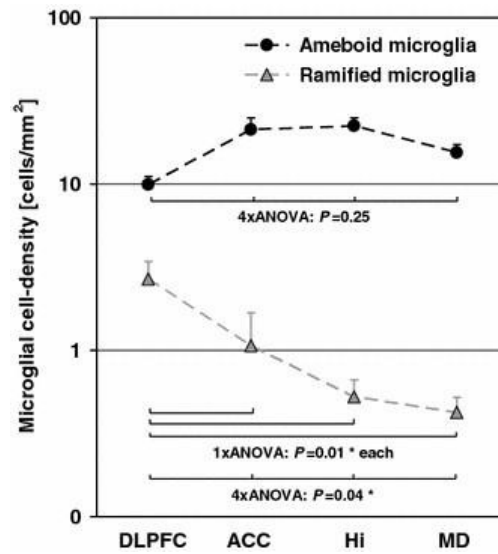
- # All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- # Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- # For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- # Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- # Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES

Electronic Figure Submission

- # Supply all figures electronically.
- # Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- # For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.
- # Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files. # Name your figure files

with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.Line Art



- ⌘ Definition: Black and white graphic with no shading.
- ⌘ Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- ⌘ All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- ⌘ Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- ⌘ Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

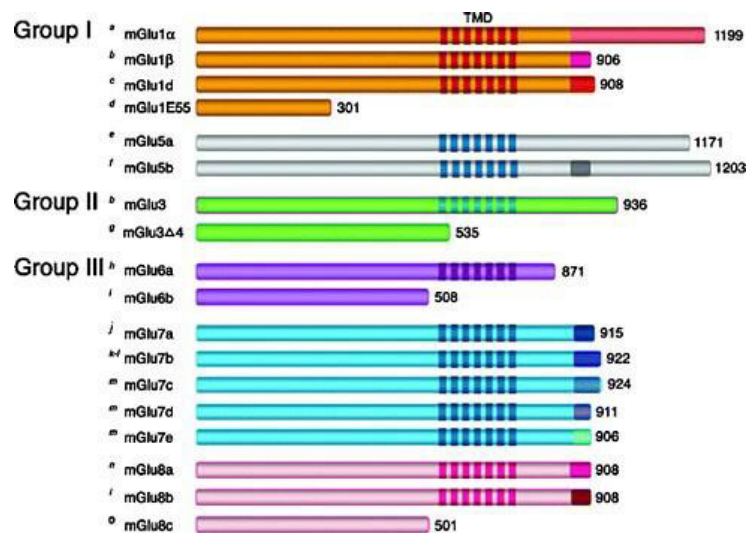
Halftone Art

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art



Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc. Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- ⌘ To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- ⌘ Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).
- ⌘ Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- ⌘ Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- ⌘ Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order. Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures,

"A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- ⌘ Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- ⌘ Figure captions begin with the term **Fig.** in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- ⌘ No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- ⌘ Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- ⌘ Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

Figures should be submitted separately from the text, if possible. When preparing your figures, size figures to fit in the column width.

For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1