UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e
microencapsulação da protease produzida pelo fungo
*Eupenicillium javanicum***

Youssef Ali Abou Hamin Neto

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e
microencapsulação da protease produzida pelo fungo
*Eupenicillium javanicum***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Youssef Ali Abou Hamin Neto

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

***Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 04/09/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.**

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Hamin-Neto, Youssef Ali Abou

Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação
da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

60 p., 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos
Naturais e Sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia

2. Enzimologia

3. Bioencapsulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Youssef Ali Abou Hamin Neto

Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais,
Zalfa e Ali (*in memoriam*) que me
deram suporte para esta conquista.

Agradecimentos

Agradeço a todos aqueles que me ajudaram direta e indiretamente neste trabalho.

Aos meus pais, Zalfa e Ali (*in memoriam*), pelo carinho e pelo incentivo, ao meu irmão, Amir, pelo companheirismo.

À minha família do Líbano que mesmo longe sempre me apoiou e se preocupou com as minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela orientação e amizade.

Aos meus amigos e companheiros de trabalho do laboratório de Tecnologia Enzimática, pelo apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. Luis Alexandre Pedro de Freitas e a equipe de seu laboratório pela colaboração neste trabalho

Aos meus amigos da Universidade Federal de Alfenas, que continuam me acompanhando e me apoiando após o fim da graduação.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto (Turma da Manguaça) pela amizade e por estarem junto comigo durante tantos anos me incentivando.

Aos meus amigos do Mercado da Zalfa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

Às agências de fomento, CAPES, CNPQ e FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

HAMIN-NETO, Y. A. A. Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. 2012. 67 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Foram analisados alguns parâmetros que influenciam os bioprocessos, submerso e sólido, do fungo *Eupenicillium javanicum* na produção de peptidases. No bioprocessos submerso foram avaliados a influência de diferentes concentrações e tipos de fonte de carbono e concentrações de fonte nitrogênio no meio, pH, temperatura e tempo de incubação. No bioprocessos sólido avaliou-se a influência de dois tipos de resíduos agroindustriais, em diferentes proporções, dois tipos de fonte de nitrogênio, em diferentes concentrações, tempo e temperatura de incubação. As peptidases produzidas em ambos os bioprocessos foram caracterizadas bioquimicamente, avaliando pH e temperatura ótima, estabilidade em diferentes temperaturas e valores de pH e influência da adição de íons e inibidores na atividade da peptidase. A enzima produzida em bioprocessos sólido foi submetida ao processo de purificação utilizando métodos cromatográficos. Utilizando a peptidase pura realizou-se a caracterização bioquímica funcional e a determinação dos parâmetros cinéticos, ambos utilizando o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência. Além disso, o extrato enzimático obtido através do bioprocessos foi submetido ao processo de microencapsulação, visando uma maior estabilidade das peptidases e facilidade no armazenamento e transporte, utilizando a técnica de *Spray drying*, em seguida foi avaliado o rendimento do processo e a estabilidade das peptidases das micropartículas produzidas. O fungo *Eupenicillium javanicum* mostrou potencial na produção de peptidases em ambos bioprocessos, produzindo peptidases da classe das metalopeptidases com alta estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura. O processo de purificação mostrou-se viável e reprodutível. A análise dos parâmetros cinéticos revelou uma grande influência do lado “linha” da peptidase na eficiência catalítica. O processo de microencapsulação mostrou-se viável e gerou micropartículas estáveis. A peptidase produzida apresentou características que demonstram seu potencial uso nas diferentes áreas industriais.

Palavras-chave: biotecnologia, enzimologia, encapsulação, peptidase, bioprocessos.

Abstract

HAMIN-NETO, Y. A. A. Fermentation, purification, biochemical characterization, and microencapsulation of protease produced by the fungus *Eupenicillium javanicum*. 2012. 67 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Some parameters that influence the submerged and semi solid bioprocesses, by the fungus *Eupenicillium javanicum* in the peptidases production, were conducted. In submerged bioprocess was evaluated the effect of different concentrations and types of carbon source and nitrogen source in the medium, pH, temperature and incubation time. In semi solid bioprocess semi solid was evaluated the influence of two types of agroindustrial residues, in different proportions, and different concentrations of nitrogen source, temperature and of incubation time. The peptidases produced in both bioprocesses were characterized biochemically, evaluating, the optimum pH and temperature, stability at different temperatures and pH values and the influence of the addition of ions and inhibitors on peptidase activity. The enzyme produced in semi solid bioprocess was subjected to the purification process using chromatographic methods. Using pure peptidase was performed the biochemical characterization and determination of kinetic parameters, both using the fluorescence intramolecular suppression peptide substrate. Furthermore, the enzymatic extract obtained by semi solid bioprocess was subjected to microencapsulation process by using the technique of spray drying, in order to obtain greater stability, ease storage and transport of peptidases, then assessed the yield process and stability of the peptidases of microparticles produced. The fungus *Eupenicillium javanicum* showed potential production of peptidases in the both bioprocesses, producing peptidases that belong to the class of metallopeptidases, with high stability at different pH and temperature. The purification process was feasible and reproducible. The analysis of kinetic parameters revealed a strong influence of the "line" side on the peptidase catalytic efficiency. The microencapsulation process was feasible and generated stable microparticles. The peptidase produced has characteristics that demonstrated it a potential use in different industrial fields.

Keywords: biotechnology, enzymology, bioencapsulation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eupenicillium javanicum</i> em meio de cultura sabouraud.	04
Figura 2. Esquema do equipamento de spray drying (imagem adaptada de ROSA et al., 2006).	09
Figura 3. Panorama geral das etapas do estudo e a sequência de como foi conduzido.	11
Figura 4. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).	18
Figura 5. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999).	21
Figura 6. Influência da concentração de caseína como fonte de nitrogênio, no bioprocessamento submerso do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , para produção de peptidases em pH 6,0, incubado a 30°C e 120 rpm.	25
Figura 7. Influência da concentração de prótons (pH) na produção de peptidase pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> . O meio foi suplementado com 0,25% de caseína, incubado a 30 °C e 120 rpm.	26
Figura 8. Influência da temperatura no bioprocessamento submerso do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , para produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , em pH 5,0 e meio suplementado com 0,25% de caseína a 120 rpm.	27
Figura 9. Influência dos resíduos agroindustriais, FT e FA, na produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , mantido a 30 °C.	28
Figura 10. Influência da concentração de albumina, em bioprocessamento sólido, para produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , utilizando farelo de trigo como meio, incubando a 30°C.	28
Figura 11. Influência da concentração de caseína em bioprocessamento sólido para produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , utilizando farelo de trigo como meio incubando a 30°C.	29
Figura 12. Influência da temperatura na produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , em meio contendo 90% de farelo de trigo e 10% de albumina, quando incubado em diferentes temperaturas.	30
Figura 13. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade das peptidases, produzidas por fermentação submersa (a) e sólida (b), pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína a 40°C.	31
Figura 14. Influência da temperatura na atividade proteolítica de peptidase, produzidas por fermentação submersa (a) e sólida (b), pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 5,5.	31

- Figura 15.** Estabilidade da peptidase frente a variação de pH, obtidas pelo bioprocesso submerso (a) e sólido (b) pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição ao pH, com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,5 durante 60 minutos. 34
- Figura 16.** Estabilidade da peptidase frente à exposição a variação da temperatura em função do tempo, obtidas pelos bioprocessos submerso (a) e sólido (b), determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,0. 34
- Figura 17.** Perfil de eluição das proteínas contidas no precipitado do bioprocesso sólido, utilizando a resina sephadex G-50. A eluição foi utilizando tampão acetato 50 mM pH 5,5. O fluxo foi de 0,62 mL/min, e frações com 5mL. 36
- Figura 18.** Perfil de eluição das proteínas contidas no isolado com atividade proteolítica eluído da cromatografia sephadex G-50. Foi utilizada a resina aniônica (Q-resource), com o gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Para a eluição das proteínas. O fluxo foi mantido em 4 mL/min e foram coletadas frações de 2 mL. 36
- Figura 19.** Gel SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata das etapas de produção da peptidase pelo fungo *E. javanicum* (a) marcador de baixa massa molecular e (b) peptidase purificada pela cromatografia de troca iônica em resina aniônica (Q-resource). 36
- Figura 20.** Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica de peptidases purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C. 37
- Figura 21.** Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,0. 38
- Figura 22.** Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes valores de pH. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, pH 6,0. 40
- Figura 23.** Superfície de resposta do rendimento do processo de microencapsulação da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em função da temperatura e proporção EB/Ad. 47
- Figura 24.** Superfície de resposta da atividade enzimática, da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, após do processo de microencapsulação em função da temperatura e proporção EB/Ad. 47
- Figura 25.** Aspecto das micropartículas, obtidas através do processo de *Spray Drying*, observadas através de microscopia eletrônica de varredura. 48
- Figura 26.** Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, microencapsuladas, pelo do processo de *Spray Drying* com diferentes temperaturas, proporção EB/Ad e VA. O armazenamento foi realizados durante os períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias a 25 °C. 50

Figura 27. Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, microencapsuladas, pelo do processo de *Spray Drying* com diferentes temperaturas, proporção EB/Ad e VA. O armazenamento foi realizados durante os períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias a 4 °C. 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros do Aparelho de <i>Spray Dryer</i> ajustados para secagem e microencapsulação da peptidase obtida por bioprocesso em meio sólido (90%(m/m) de farelo de trigo + 10%(m/m) de albumina a 30°C durante 72 horas) pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> .	22
Tabela 2. Desenho experimental para microencapsulação do extrato enzimático produzido pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> em bioprocesso em meio sólido.	23
Tabela 3. Influência da fonte de carbono no bioprocesso submerso para produção de peptidases pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> , com meio suplementado com 0,5% de caseína, em pH 6,0, incubado a 30°C e 120 rpm..	26
Tabela 4. Influência de íons sobre a atividade das peptidases produzidas por bioprocessos submerso (BSM) e bioprocessos sólido (BES) pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> . A atividade proteolítica foi determinada com o substrato azocaseína a 40°C em tampão MES pH 5,5, com concentração final de íons de 10 mM.	32
Tabela 5. Influência da adição de inibidores, na atividade proteolítica de peptidases obtidas do bioprocessos submerso (BSM) e bioprocessos sólido (BES), pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> . A atividade proteolítica foi determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.	33
Tabela 6. Etapas de purificação da peptidase, produzida em bioprocessos em estado sólido, pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> .	35
Tabela 7. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica de peptidase produzida em bioprocessos sólido pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> . O ensaio foi determinado na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,0, a concentração final dos íons foi de 10 mM.	39
Tabela 8. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica de peptidases produzidas em bioprocessos semisólido pelo fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> . A atividade proteolítica determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,0, a concentração final dos inibidores foi de 10 mM.	39
Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> do subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P ₁ , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.	41
Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> do subsítio S ₂ , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P ₂ , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.	42
Tabela 11. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> do subsítio S ₃ , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P ₃ , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.	43
Tabela 12. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Eupenicillium javanicum</i> do subsítio S ₁ , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-	44

EDDnp, com substituições na posição P_1 , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Tabela 13. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_2 , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0. 44

Tabela 14. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_3 , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0. 45

Tabela 15. Percentual de rendimento do processo de microencapsulação da peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em fermentação em estado sólido. 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alanina
Ad	Adjuvante
AIA	Ácido iodoacético
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i> (demanda bioquímica de oxigênio)
BSM	Bioprocesso submerso
BES	Bioprocesso sólido
E	Ácido glutâmico
EB	Extrato bruto
EB/Ad	Proporção extrato bruto/adjuvante
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ES	Extrato produto da sedimentação
F	Fenilalanina
FA	Farelo de algodão
FRET	Transferência de energia entre dois fluoróforos
FT	Farelo de trigo
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
K	Lisina
L	Leucina
M	Metionina
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
P	Prolina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonila
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
TCA	Ácido tricloroacético
UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
V	Valina
VA	Vazão de alimentação
W	Triptofano
Y	Tirosina

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Enzimas industriais	1
1.2 Peptidases	1
1.3 Bioprocessos	3
1.4 <i>Eupenicillium javanicum</i>	4
1.5 Aplicação industrial das peptidases	5
1.5.1 Indústria farmacêutica	5
1.5.2 Peptidases aplicadas na indústria de cosméticos	6
1.5.3 Produção de detergentes	6
1.5.4 Indústria de couro e tratamento de resíduos	6
1.5.5 Aplicação em alimentos	7
1.6 Microencapsulação	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Isolamento, identificação e manutenção do micro-organismo	11
3.2 Preparo do inóculo	11
3.3 Bioprocessos em meio submerso	12
3.4 Bioprocessos em meio sólido	13
3.5 Purificação	14
3.5.1 Precipitação e fracionamento por etanol	14
3.5.2 Cromatografia	14
3.5.3 Avaliação do grau de pureza e tamanho da peptidase	15
3.6 Avaliação do grau de pureza com substrato caseína	16
3.7 Avaliação do grau de pureza com substrato azocaseína	16
3.8 Caracterização bioquímica parcial dos extratos dos bioprocessos submerso e sólido	17
3.8.1 Efeito de pH e Temperatura	17
3.8.2 Efeito de íons e inibidores	17
3.9 Ensaio de caracterização bioquímica funcional	18
3.9.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência	18
3.9.2 Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional utilizando os substratos FRET	18
3.9.3 Efeito de pH e temperatura	19
3.9.4 Efeito de íons e inibidores	19
3.10 Estudos de cinética enzimática	20
3.10.1 Determinação de concentração molar da enzima purificada	20
3.10.2 Ensaios cinéticos com substrato sintético	20
3.11 Microencapsulação	22

3.11.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	23
3.11.2 Estabilidade das micropartículas.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
4.1 Bioprocesso em meio submerso.....	24
4.2 Bioprocesso em meio sólido	26
4.3 Caracterização bioquímica parcial dos extratos dos bioprocessos submerso e sólido	30
4.4 Purificação.....	35
4.5 Ensaio de caracterização bioquímica funcional.....	37
4.6 Estudos de cinética enzimática.....	40
4.7 Microencapsulação.....	45
4.7.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	48
4.7.2 Estabilidade das micropartículas.....	49
5. CONCLUSÕES	52
6. REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas industriais

As enzimas, de maneira geral, apresentam grande importância devido às características físico-químicas que regem uma reação enzimática, e também pela especificidade dos substratos, que podem influenciar diretamente na atividade da enzima. Além disso, o fato das enzimas apresentarem baixa toxicidade, podem ser amplamente empregadas em processos industriais (SANCHEZ; DEMAINE, 2011).

Dentre as enzimas mais vendidas no mundo, estão as hidrolases (RAO et al., 1998). Essas enzimas catalisam a quebra de seus substratos na presença de moléculas de água.

As hidrolases englobam diferentes enzimas, como podemos ressaltar as carboidrases, lipases, e peptidases, sendo estas as mais utilizadas nas indústrias (RAO et al., 1998). Essas enzimas representam cerca de 60% das enzimas mais vendidas em todo o mundo (CHANALIA et al., 2011; RAO et al., 2009; PARANTHAMAN et al., 2009; RAO et al., 1998).

O mercado industrial de enzimas em 1998 alcançou 1,6 bilhões de dólares. Após 11 anos, ou seja, em 2009, esse mercado alcançou 5,1 bilhões de dólares, praticamente triplicando o faturamento e mostrando um crescimento contínuo. O descobrimento de novas enzimas pode auxiliar em outros processos, o que promoverá um aumento ainda maior no comércio mundial de enzimas (SANCHEZ; DEMAINE, 2011).

1.2. Peptidases

As peptidases podem ser conhecidas como proteases, proteinases, enzimas proteolíticas ou simplesmente peptidases nome este que é sugerido pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, Comitê de Classificação de enzimas, (RAWLINGNS et al., 2011).

As peptidases são uma classe única de enzimas que ocupam uma posição central devido as suas aplicações em diferentes áreas, tais como processos fisiológicos, aplicações comerciais, biotecnológicas e outras (RAO et al., 1998; SAVITHA et al., 2011).

Dentre as indústrias, as quais as peptidases podem ser utilizadas, destacam-se a de alimentos, de detergentes, de couro, medicamentos (VISHWANATHA; RAO, 2010; RAI; MUKHERJEE, 2011) e biorremediação (GUPTA et al., 2002).

As peptidases catalisam a hidrólise de polipeptídeos em peptídeos e aminoácidos, de acordo com sua ação catalítica (WU; CHEN, 2011). Elas são encontradas em várias fontes (animal, vegetal e microbiana) (CHANALIA et al., 2011; CHUTMANOP et al., 2008; HAQ et al., 2006; RAO et al., 1998).

Quanto à fonte, os micro-organismos são os mais utilizados, sendo que 40% das peptidases vendidas no mundo são de origem microbiana (SANDHYA et al., 2005; CHANALIA et al., 2011; GUPTA et al. 2002).

Peptidases microbianas são produzidas através de bioprocessos fermentativos. Essas enzimas despertam maior interesse devido à diversidade biológica e susceptibilidade à manipulação genética dos micro-organismos (RAO et al., 1998; CHANALIA et al., 2011). Além disso, micro-organismos apresentam facilidade e rapidez no crescimento e necessitam de espaço reduzido para a produção de peptidases (WU et al., 2006).

Adicionalmente apresentam diferentes respostas na produção de peptidases em relação à mudança dos parâmetros de meio do bioprocesso (AGRAWAL et al., 2004; HAJJI et al., 2008).

Fungos, bactérias e leveduras podem ser utilizados como fonte de peptidases (RADHA et al., 2011). No presente estudo, as peptidases foram produzidas por fungo filamentoso em bioprocessos submerso e sólido.

As peptidases fúngicas apresentam algumas vantagens, dentre elas, a facilidade na remoção do micélio, do meio de bioprocesso (ALVES et al., 2005). Além disso, fungos apresentam a capacidade de crescer em ambientes sob as mais diversas condições, tais como, tempo, temperatura, pH e variando os nutrientes do meio do bioprocesso (HAQ et al., 2006, MUTHULAKSHMI et al., 2011).

Em relação à ação catalítica, as peptidases são classificadas em endopeptidases e exopeptidases, sendo que as endopeptidases atuam distantes das extremidades amino e carboxi terminal, e as exopeptidases atuam próximas das extremidades amino e carboxi terminal, sendo subclassificadas em aminopeptidases e carboxipeptidases, dependendo de qual extremidade atuam (RAO et al., 1998).

As peptidases também são caracterizadas em relação ao grupo funcional presente no seu sítio catalítico (serino, cisteína, metalo, aspártica, treonina e glutamino) (RAO et al., 1998).

No presente trabalho, nosso estudo foi direcionado para metalopeptidase produzida em bioprocesso sólido, secretada pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.

Metalopeptidases são diversificadas em relação ao sítio catalítico, quando comparado com as outras classes, são caracterizadas por serem ativadas na presença de metais divalentes (RAO et al., 1998). Esses metais ativam a molécula de água tornando-a nucleófila no mecanismo da catálise (WU; CHEN, 2011). Assim, semelhante a que ocorre nas peptidases aspárticas, a molécula de água medeia o ataque nucleofílico à ligação peptídica (KONDO, 2012).

1.3. Bioprocessos

Peptidases têm sido produzidas por bioprocessos em meio submerso e sólido. Cada organismo apresenta suas melhores condições para a produção máxima de enzimas, de acordo com as características físico-químicas do meio que é oferecido para o micro-organismo (SANDHYA et al., 2005).

O bioprocesso submerso (BSM) é caracterizado pela presença dos nutrientes dissolvidos em meio líquido, apresenta como vantagens um maior controle da temperatura, pH, aeração e agitação do meio de cultura, além disso, a distribuição homogênea dos nutrientes e micro-organismos, evitando a concentração dos micro-organismos e dos produtos gerados por eles (SINHA; SINHA, 2009).

O bioprocesso sólido (BES) se assemelha ao habitat natural dos fungos, dessa maneira, os fungos têm uma preferência por esse tipo de meio para crescer e secretar os produtos, que possuem um valor agregado, por exemplo, as enzimas (SINGHANIA et al., 2009). Esse bioprocesso é caracterizado pela ausência ou quase ausência de água disponível no meio, apenas o suficiente para manter o metabolismo e crescimento do micro-organismo. A utilização de resíduos agroindustriais pode oferecer ao micro-organismo um suporte que é insolúvel que servirá para o micro-organismo e também dependendo do suporte servir como fonte de nitrogênio e carbono (PANDEY et al., 2000).

Como vantagens deste sistema de bioprocessos podemos citar, o baixo requerimento energético e hídrico, a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais (SANDHYA et al., 2005), que diminui os custos do bioprocesso para

a produção de enzimas, e contribuindo com a diminuição da poluição ambiental gerado pelo acúmulo destes resíduos (SINGHANIA et al., 2009).

1.4. *Eupenicillium javanicum*

Figura 1. *Eupenicillium javanicum* em meio de cultura sabouraud.

No presente estudo, o fungo filamentoso *Eupenicillium javanicum* (figura 1) foi utilizado para a produção de peptidases em sólido e submerso.

Há poucos relatos na literatura em relação à produção de peptidases por esse fungo, porém ele demonstrou viabilidade na produção de outras enzimas e produtos em alguns trabalhos. Tanaka et al. (2000) demonstraram produção de xilanases e celulases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em bioprocesso submerso. Nakadate et al. (2007) isolaram e identificaram 3 derivados de decalina, com ação antifúngica, do extrato produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.

Estudos de Nakadate et al. (2008) demonstraram que o extrato proveniente do fungo *Eupenicillium javanicum* apresentou forte atividade antifúngica contra *Aspergillus fumigatus*. Apresentou atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella enteritidis*, mostrando o potencial de seu extrato como matéria-prima para antifúngicos e antibacterianos.

Esses estudos demonstraram que existe um interesse na exploração do potencial do fungo *Eupenicillium javanicum*, podendo tornar-se alvo para aplicação industrial, frente a isso, estudamos a produção de peptidases por este micro-organismo.

1.5. Aplicação industrial das peptidases

O interesse na produção de peptidases, em altas concentrações e baixo custo, é devido a sua grande importância no mercado mundial de enzimas e também a sua ampla aplicabilidade, assim apresentaremos um pequeno relato sobre as aplicações das peptidases.

1.5.1. Indústria farmacêutica

A aplicação desta subclasse de enzimas na indústria farmacêutica está crescendo a cada ano, em função de novas pesquisas de aplicações e do descobrimento de novas fontes produtoras.

Dentre as peptidases utilizadas na indústria farmacêutica podemos destacar as collagenases, queratinases e elastases.

As collagenases agem sobre as fibras de colágeno podendo gerar peptídeos que apresentam diversas atividades biológicas de interesse industrial com aplicação em várias áreas, em geral para agentes imunoterapêuticos (TSURUOKA et al., 2003). Além disso, essas enzimas são amplamente utilizadas em práticas médicas, tais como remoção de manchas e quelóides, tratamento de queimaduras, úlceras e em estudos científicos (SUKHOSYROVA et al., 2003).

Aspergillus niger LCF9, produz uma peptidase alcalina que apresenta alta atividade collagenolítica, sendo utilizada na obtenção de peptídeos de baixa massa molecular de potencial terapêutico (KUMAR; TAKAGI, 1999).

As queratinases são enzimas que promovem a hidrólise de proteínas fibrosas e insolúveis denominadas queratinas. Há estudos na indústria farmacêutica, para a utilização dessas queratinases para a remoção de calosidades de seres humanos. Outra possível aplicação das queratinases é na remoção da queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses causadas por fungos dermatófitos (BOM; VERMELHO, 2004).

A peptidase elastase, extraída do *Bacillus subtilis* 316M com alta atividade elastolítica, foi imobilizada sobre bandagem para aplicações terapêuticas no tratamento de queimaduras purulentas, edemas, furúnculos e abscessos profundos (KUMAR; TAKAGI, 1999).

Além dessas enzimas, peptidases, específicas em hidrolisar ligações peptídicas próximas a resíduos de prolina, apresentam grande importância na terapia contra a diarreia celíaca (SHAN et al., 2004). Essa doença também

conhecida como doença celíaca ou enteropatia sensível ao glúten é uma doença autoimune do intestino delgado, causada pela ingestão das proteínas do glúten de ampla prevalência em fontes de alimentos tais como trigo, centeio e cevada. Ela comumente aparece de forma precoce na infância apresentando diferentes sintomas, incluindo diarreia crônica e distensão abdominal. O principal componente tóxico do glúten do trigo é a proteína gliadina com regiões ricas em prolina e glicina (SHAN et al., 2002).

1.5.2. Peptidases aplicadas na indústria de cosméticos

Enzimas com ação sobre o colágeno, queratina e elastina são empregadas em vários processos da indústria de cosméticos, tais como, cremes esfoliantes e pomadas (GUPTA et al., 2002).

A aplicação de collagenases, além de apresentar ação direta nas fibras de colágeno, está relacionada na formulação de cremes através da liberação de peptídeos com atividade biológica (TSURUOKA et al., 2003).

1.5.3. Produção de detergentes

As peptidases compõem um dos ingredientes essenciais na produção de detergentes que podem ser empregados na remoção de resíduos de alimentos, sangue e secreções corporais, além da lavagem de reagentes, como os usados na limpeza de lentes de contato e dentaduras (RAO et al., 1998).

O maior emprego das peptidases é no preparo de detergentes, devido a estabilidade em valores de pH alcalino e temperaturas altas, além de agir em uma ampla variedade de substratos proteicos em combinação com amilases, celulasas e lipases (RAO et al., 1998).

Rai e Mukherjee (2009) isolaram do micro-organismo *Bacillus subtilis* uma peptidase que apresentou compatibilidade com a formulação e potencial para aplicação em indústria de detergentes. Resultados semelhantes foram observados para peptidases produzidas pelos fungos *Graphium putredinis* e *Trichoderma harzianum* (SAVITHA et al., 2011).

1.5.4. Indústria de couro e tratamento de resíduos

A utilização de aditivos químicos perigosos no tratamento de couro em curtumes pode ser substituída por ação de peptidases com atividade queratinolítica.

O uso dessas enzimas assegura a redução da poluição ambiental e também a melhoria na qualidade do couro, sendo sua utilização baseada na hidrólise seletiva de proteínas não colágenas e não fibrosas como albumina e globulina (RAO et al., 1998).

A protease alcalina isolada do *Thermoactinomyces* sp. mostrou potencial efeito no tratamento de couro de animais, sem qualquer efeito adverso sobre a pele e ainda com a recuperação dos pelos, os quais podem ser utilizados para outros fins (VERMA et al., 2011).

Foi observado que uma peptidase isolada de *Bacillus subtilis* tem potencial para aplicação em indústria de tratamento de couro (RAI; MUKHERJEE, 2009).

Outra utilização das peptidases pode ser na degradação de proteínas fibrosas animais em penas, chifres, cabelos e unhas disponíveis como resíduos naturais. Por exemplo, peptidases alcalinas de *Bacillus subtilis* são empregadas em resíduos de indústria de couro para produção de produtos úteis, como cola de uso em carpintaria e suplemento proteico de ração animal (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997).

1.5.5. Aplicações em alimentos

O uso de peptidases na indústria alimentícia vem desde a antiguidade na panificação, na produção de queijos e de hidrolisados de proteínas.

Na panificação, peptidases (endopeptidases e exopeptidases) de *Aspergillus oryzae* têm sido utilizadas na hidrólise limitada das proteínas insolúveis (glúten) da farinha de trigo, garantindo melhor solubilidade e redução no tempo de preparo da massa de pão (RAO et al., 1998).

No laticínio, a principal aplicação é na produção de queijos a partir da coagulação do leite (RAO et al., 1998).

Segundo Sinha et al. (2007), as proteínas do soro de leite, resultante do processo de produção de queijo, apresentam alto valor nutritivo e vêm ganhando aceitação na utilização como suplemento alimentar de derivados lácticos. Essas proteínas constituem-se de aminoácidos essenciais e aminoácidos sulfonados (cisteína) de importante função antioxidante. Sua hidrólise é realizada por peptidases ácidas e alcalinas, que dispõe peptídeos livres biologicamente ativos e que têm sido empregados como importante fonte de aminoácidos em casos de intolerância infantil a proteínas do leite.

A hidrólise de proteínas da soja vem sendo realizada por peptidases alcalinas e neutras. Essas modificações proteicas melhoram propriedades funcionais como solubilidade e sabor (RAO et al., 1998).

Nos hidrolisados proteicos, as peptidases também vêm sendo utilizadas para o melhoramento do sabor. Em geral, esses hidrolisados de proteína podem apresentar sabor amargo decorrente da liberação de resíduos peptídicos contendo aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades e resíduo de prolina no centro da molécula. Para remoção do gosto amargo, algumas endo e exopeptidases têm sido amplamente estudadas como valiosas ferramentas de clivagem específica de aminoácidos hidrofóbicos e prolina (FITZGERALD, 2006).

1.6. Microencapsulação

O processo de secagem é um dos possíveis caminhos para se obter uma enzima mais estável e de fácil armazenamento. A remoção da água reduz a liberdade de movimento das moléculas de proteína e, com isso, inibe mudanças conformacionais, as quais podem levar à perda da atividade das enzimas e também pode ocorrer a oxidação de resíduo do sítio catalítico levando a perda da atividade (BELGHITH et al., 2001).

A técnica de *Spray drying* tem sido utilizada para a desidratação de muitas enzimas como as peptidases e celulasas, e oferece vantagens de custo em comparação com a liofilização. No entanto, desidratação pela técnica de secagem por *spray drying* pode prover o desdobramento, ou seja, a desnaturação pela temperatura elevada, o que ocasiona a perda de atividade. Este desdobramento é geralmente minimizado pelo uso de aditivos, tais como polissacarídeos e alguns sais (ALLOUE et al., 2007).

Essa técnica é simples, rápida e econômica para obtenção de um determinado pó de uma solução ou de uma suspensão líquida, por exemplo, suspensão de enzima. Pó com o teor de matéria seca superior a 90% são mais fáceis de manusear e de preservar do que as preparações líquidas. Ao contrário de liofilização, *spray drying* é geralmente considerado como um método atraente para a preparação de grandes quantidades de produtos a serem secados, devido ao baixo custo e complexidade do processo (ALLOUE et al., 2007)

A técnica de secagem por *spray drying* consiste em três etapas de funcionamento: a atomização, desidratação e coleta de pó. A solução de proteína é

pulverizada por um bico atomizador em uma câmara de secagem. Auxiliada pela grande área de superfície específica das gotas e o ar quente, a desidratação ocorre em questão de segundos na câmara de secagem (AMERI; MAA, 2006).

Na figura 2 pode-se observar esquema do aparelho de *spray dryer*, o qual é constituído por: 1) Sistema de bombeamento e controle de vazão da alimentação do material a ser seco; 2) Sistema de atomização; 3) Sistema de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem; 4) Sistema da alimentação de ar para secagem; 5) Câmara de secagem; 6) Sistema de separação ar-pó seco e coleta (ROSA et al., 2006).

Figura 2. Esquema do equipamento de *spray drying* (imagem adaptada de ROSA et al., 2006).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os parâmetros dos bioprocessos submerso e sólido para a produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, purificar as enzimas produzidas, caracterizar bioquimicamente a enzima pura e determinar os parâmetros e microencapsular a enzima proveniente do BES.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Realizar estudos dos bioprocessos sólido e submerdo do fungo *Eupenicillium javanicum* variando o meio de cultivo, tempo de fermentação, temperatura e pH do meio, determinando quais são os melhores parâmetros do bioprocessos para produção de peptidases visando uma maior produção, menor custo e tempo;
- Realizar processos cromatográficos para purificação da peptidase obtida do BES;
- Realizar a caracterização bioquímica da peptidase isolada do BES, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência.
- Determinação dos parâmetros cinéticos e especificidade dos subsítios da peptidase do BES, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência.
- Realização do processo de microencapsulação da peptidase através da técnica de *spray drying*, e avaliando rendimento do processo e estabilidade da peptidase nas micropartículas produzidas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A figura 3 mostra um panorama geral de o que foi realizado neste trabalho e a sequência de como foi conduzido o estudo.

Figura 3. Panorama geral das etapas do estudo e a sequência de como foi conduzido.

3.1. Isolamento, identificação e manutenção do micro-organismo

O fungo *Eupenicillium javanicum*, foi isolado de silagem e identificado pelo grupo da Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta responsável pela micoteca da UFPE. Este fungo pertence à coleção de micro-organismos do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral. O fungo é mantido em tubo de ensaio, contendo o meio de cultura sabouraud, armazenado a 4°C.

3.2. Preparo do inóculo

Para a ampliação e preparo do inóculo, foram utilizados vários tubos de ensaio, com meio sabouraud, contendo o fungo, foi preparado uma suspensão com o material fúngico com o auxílio de água estéril no bioprocessamento submerso, e solução

salina estéril (0,1% (m/v) dos seguintes sais: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NH_4NO_3) no bioprocesso sólido. Com o auxílio de uma espátula estéril a superfície do meio de cultura contendo o fungo foi raspada, as suspensões obtidas em cada tubo de ensaio foram reunidas e 1 mL dessa suspensão foi utilizada como inóculo (MERHEB et al., 2007).

3.3. Bioprocesso em meio submerso

Em erlenmeyer de 250mL foram adicionados 50mL de meio líquido contendo KH_2PO_4 , 0,7% (m/v); K_2HPO_4 , 0,2% (m/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% (m/v); NaCl, 0,5% (m/v); extrato de levedura, 0,1% (m/v); caseína, 0,5% (m/v); peptona, 0,5% (m/v) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1% (m/v); modificado de Tran e Nagano (2002). Após o preparo, o pH do meio foi corrigido com NaOH 1 M ou HCl 1 M para 6,0 e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Este meio foi denominado meio líquido padrão. O meio foi inoculado após ter sido autoclavado.

Todos os frascos erlenmeyers foram incubados por um período de 24 a 168 horas, a 30°C (com exceção do estudo de variação de temperatura) e com rotação de 120rpm, sendo que a cada 24 horas um frasco de cada parâmetro estudado foi retirado.

Após cada bioprocessos, procedeu-se a filtração do material em papel de filtro Whatman nº1. O filtrado foi denominado de extrato enzimático bruto (EB) e foram realizados os ensaios enzimáticos de cada estudo dos bioprocessos, os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram realizados estudos para análise do tempo de bioprocessos, efeito da concentração e do tipo de fonte de carbono, variação das concentrações de caseína, variação do pH do meio de cultura e variação da temperatura de incubação.

Para análise do efeito da fonte de carbono no bioprocessos do fungo *Eupenicillium javanicum*, frascos do tipo erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio padrão foram suplementados com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) e em diferentes porcentagens (0,1%, 0,5% e 1%).

A avaliação do efeito do indutor, caseína, na produção de peptidases foi realizada através da suplementação do meio líquido padrão (sem caseína) nas seguintes concentrações: 0,25%; 0,5% e 1,0%.

Para análise do efeito do pH, foi preparado o meio líquido padrão, suplementado com 0,25% de caseína, devido o seu efeito de modulação positiva na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, variando o pH para 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

O estudo para determinação do tempo ótimo de bioprocesso procedeu-se utilizando meio líquido padrão, com a concentração ótima de indutor (caseína) e melhor pH do meio do bioprocesso.

Para análise do efeito da temperatura, foi preparado o meio líquido padrão com a melhor concentração de caseína (0,25%) e com o pH (5,0), ou seja, nas condições nas quais o fungo *Eupenicillium javanicum* apresentou maior produção de peptidases. Em seguida esses meios foram incubados nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45°C.

3.4. Bioprocesso em meio sólido

Um pré-estudo foi realizado para avaliar a influência do tipo de resíduo agroindustrial e a sua proporção na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, com o objetivo de estabelecer o meio padrão para a produção de peptidases em bioprocesso em meio sólido. Foram utilizados farelo de trigo (FT) e farelo de algodão (FA), nas proporções FT/FA (1:0), FT/FA (0:1) e FT/FA (1:1), devido a melhor produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em FT/FA (1:0), este foi adotado como base para o meio padrão juntamente com a solução salina constituída de 0,1% (m/v) dos seguintes sais: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NH_4NO_3 . A partir deste meio padrão, alguns parâmetros que podem influenciar a produção de peptidase em bioprocesso sólido foram avaliados, como fonte tipo e concentração de fonte de nitrogênio, temperatura e tempo.

Em frascos, tipo erlenmeyers de 250 mL, foram adicionados 5 g de cada concentração juntamente com 9,0mL de solução salina, em seguida os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C por 40 minutos. A umidade foi de 60% (MERHEB et al., 2007). Em seguida o meio foi inoculado com a suspensão de micélio e incubado em câmara climatizada (BOD) a 30°C.

A cada 24 horas, durante 168 horas, um frasco de cada concentração foi retirado, em seguida em cada frasco foi adicionado 40 mL água destilada a 4°C para a solubilização das enzimas. A solubilização das enzimas foi auxiliada com a

maceração através de um bastão de plástico e em seguida estes frascos foram agitados em *shaker* a 200 rpm por 30 minutos a 4°C .

O material foi filtrado em gaze e em seguida foi centrifugado a 5000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante assim obtido foi denominado de extrato enzimático bruto (EB), o qual foi avaliado para a atividade proteolítica.

Para a avaliação da fonte de nitrogênio exógena em relação ao FT foram utilizadas albumina e caseína nas concentrações de 5, 10 e 20% em relação ao FT, sendo que a massa final de sólidos era igual a 5g. Para a análise da influência da temperatura na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em bioprocesso sólido, foi utilizado o meio padrão suplementado com 10% de albumina devido sua influência positiva na avaliação de fonte de nitrogênio, este meio foi incubado nas seguintes temperaturas 30, 35, 40 e 45°C. Em seguida procedeu-se como os outros bioprocessos em meio sólido.

A influência do tempo no bioprocesso em meio sólido foi avaliada nas melhores condições de produção, ou seja, meio padrão (FT) suplementado com 10% de albumina quando incubado a 30°C.

3.5. Purificação

3.5.1. Precipitação e fracionamento por etanol

A primeira fase da purificação foi precipitação e fracionamento por etanol, a qual ajuda retirar as impurezas que são solúveis em etanol (92,6°GL). A proporção de etanol em relação ao extrato enzimático bruto foi determinada utilizando as proporções extrato:etanol de 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. Definida a proporção, a precipitação foi realizada por 24 horas a – 20°C. O material precipitado foi centrifugado por 20 minutos a 5000g a 4°C para sedimentar. O ES foi armazenado a – 20°C. Esse sedimentado foi solubilizado em água destilada a 4°C para a caracterização bioquímica parcial do extrato enzimático e purificação.

3.5.2. Cromatografia

Com o objetivo de obter a enzima na sua forma homogênea, ou seja, o máximo possível livre de impurezas para a utilização na caracterização bioquímica com substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência, O ES foi

submetido a um processo de gel filtração em coluna (100cm x 4cm) utilizando resina Sephadex G-50.

A coluna foi equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5,0 com 50 mM de NaCl, em seguida foi aplicado 5mL da amostra (ES) e eluída pelo mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo de eluição foi ajustado para 0,62 mL/min com o auxílio de bomba peristáltica (GE). Frações de 5mL foram coletadas em tubos de ensaio utilizando coletor de frações (GE).

Nas frações coletadas foram realizadas as atividades proteolíticas e a leitura em 280nm para a determinação do perfil enzimático e proteico respectivamente. As frações que apresentaram atividade proteolítica foram submetidas à análise em gel de eletroforese SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata.

Em seguida, as frações que obtiveram semelhante grau de pureza foram submetidas a uma diálise em membrana com porosidade de 10 kDa, o objetivo da diálise foi retirar o sal e adequar o pH para a próxima etapa. Na diálise foi utilizado tampão Tris-HCl pH 8,0 50 mM durante 24 horas a 4°C com 3 trocas de tampão.

Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Q-resource (aniônica) de volume 6 mL. A coluna primeiramente foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, em seguida foi aplicado a amostra e depois foi realizado a lavagem da resina com o tampão de equilíbrio, somente após esta etapa, foi realizado o gradiente salino linear com a concentração crescente de NaCl, que foi de 50 mM a 1 M. A eluição foi realizada com o auxílio de bomba peristáltica (GE) com fluxo de 4mL/min. O eluído foi coletado em tubo de ensaio, com auxílio de coletor de frações (GE). Em seguida foi realizado o ensaio de atividade proteolítica e leituras em 280nm para determinação do perfil de eluição da peptidase. Após cada processo cromatográfico a amostra do eluído proteico foi quantificada por método descrito por Bradford (1976) utilizando curva padrão com proteína BSA.

3.5.3. Avaliação do grau de pureza e tamanho da peptidase

A pureza da peptidase das frações eluídas das cromatografias de filtração em gel e troca iônica foram certificada por gel de eletroforese desnaturante (SDS-PAGE) 12%, segundo Laemmli (1970) e coradas com nitrato de prata (SEE; JACKOWSKI, 1989). O tamanho da peptidase foi estimado através do *software* Image Lab™ version 3.0.

3.6. Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína

Atividade proteolítica foi verificada a cada etapa dos bioprocessos e purificação, através do protocolo descrito por Sarath et al. (1996) com algumas modificações.

Foi utilizado 1mL de caseína a 1% (m/v), preparada em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5, + 100 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5 + 100 µL da solução contendo a enzima. A mistura reacional foi incubada por 60 minutos a 40°C. Depois de percorrido o tempo de reação foi adicionado 600 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v) para interromper a reação, em seguida, os tubos testes e brancos foram centrifugados por 15 minutos a 10000g a 30°C. Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos contra seus respectivos brancos, em cubeta de quartzo, no comprimento de onda 280nm, em espectrofotômetro, Genesys 10S (Thermo).

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de $0,001A_{280nm}$ dentro das condições de reações usando caseína como substrato (GUPTA et al., 2002).

3.7. Avaliação da atividade proteolítica com substrato azocaseína

Antes do processo de purificação, realizou-se a caracterização da peptidase, utilizando como substrato a azocaseína. Este substrato foi requerido devido a sensibilidade e também pela curva de pH, pois em valores de pH abaixo de 5,0, a caseína não dissolve, dificultando a investigação do efeito do pH sobre a atividade proteolítica da peptidase em valores de pH ácido.

Foi utilizado 100 µL de extrato sedimentado ressuspendido, diluído em 100 µL de tampão MES pH 5,5 50mM + 200 µL de azocaseína a 1%, preparada no mesmo tampão. A mistura reacional foi incubada por 60 minutos para o BSM e 15 minutos para BES, na temperatura de 40°C, a mesma foi interrompida com 800 µL de TCA 10%, os tubos testes e controles foram centrifugados por 15 minutos a 10000g a 30°C. O volume de 466,5 µL dos sobrenadantes, dos tubos testes, foram separados e a estes foi adicionado 400 µL de NaOH 1 M, em seguida foram lidos usando cubeta de quartzo contra seus respectivos brancos, nos quais também foram adicionados 400 µL de NaOH 1M, a leitura foi feita em 440nm, em espectrofotômetro, Genesys 10S (Thermo) (DUCROS et al., 2009).

3.8. Caracterização bioquímica parcial dos extratos dos bioprocessos submerso e sólido

3.8.1. Efeito de pH e Temperatura

O pH ótimo foi determinado avaliando a atividade do ES em diferentes valores de pH, de 4,5 a 10,5 com incrementos de 0,5 unidades de pH. Os tampões utilizados foram acetato (pH 4,5 – 5,0); MES (pH 5,5 – 6,5); HEPES (pH 7,0 – 8,0); BICINE (8,5 – 9,0) e CAPS (pH 9,5 – 10,5), todos a 100 mM. A reação enzimática foi realizada de acordo com o protocolo descrito no item 3.7.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pela incubação do ES durante 60 minutos a 25°C nas faixas de pH (4,0-10,5), variando o pH com incrementos de 0,5 unidade. Em seguida foram realizados os ensaios enzimáticos, utilizando azocaseína como substrato e tampão MES 150 mM pH 5,5 (pH ótimo), seguindo o protocolo descrito no item 3.7.

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada de 30 a 80°C, com incrementos de 5°C. A reação enzimática foi realizada, como descrito no item 3.7, utilizando tampão MES 100 mM pH 5,5 (pH ótimo).

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do ES nas temperaturas de 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C nos tempos 5, 15, 30 e 60 minutos. Em seguida foram realizadas as reações enzimáticas, conforme descrito no item 3.7, utilizando tampão MES 100 mM pH 5,5 (pH ótimo).

3.8.2. Efeito de Íons e Inibidores

Para determinar o efeito de íons sobre a atividade enzimática do ES foram preparadas soluções de: NaCl, ZnSO₄, FeSO₄, Fe₂(SO₄)₃, CoCl₂, CuCl₂, NiSO₄, CaCl₂, KCl, MgCl₂, LiCl, BaCl₂ e AlCl₃ a 100 mM (estoque).

Os inibidores testados foram PMSF, EDTA e ácido Iodoacético (AIA) a 100 mM (estoque), segundo protocolo descrito por Dunn (1989).

Em cada tubo de reação foi adicionado extrato enzimático e cada solução do íon ou do inibidor, obtendo concentração final de 10 mM dos íons e inibidores. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 40°C. Em seguida, realizou-se a avaliação da atividade proteolítica com o substrato azocaseína, comparando com o controle, no qual nada foi adicionado, de acordo com protocolo descrito no item 3.7.

3.9. Ensaios de caracterização bioquímica funcional

3.9.1. Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência

A caracterização bioquímica funcional da peptidase pura, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* através de BES, foi conduzida utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência. Esse substrato possui em cada extremidade um grupo molecular, onde na região amino-terminal está presente o ácido orto-aminobenzóico (Abz), responsável pela emissão da fluorescência da molécula, e na região carboxi-terminal, encontra-se o grupo etilenodiamo-dinitro-fenil (EDDnp), grupo responsável pela supressão da fluorescência (CHAGAS et al., 1991).

O substrato funciona da seguinte maneira, enquanto não estiver clivado, ou seja, com as extremidades Abz e EDDnp próximas, o grupo EDDnp promove a supressão da fluorescência emitida pelo grupo Abz. Após a ação da peptidase, a qual promove a hidrólise do substrato, ocorre o distanciamento entre os grupos Abz e EDDnp, consequentemente aumentando a fluorescência (SANTOS, 2009), figura 4.

Figura 4. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).

3.9.2. Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional utilizando os substratos FRET.

A reação enzimática foi realizada em espectrofluorímetro modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific) acoplado com sistema Peltier 4-Position Fluorescence Cell Holder que controla a agitação e temperatura, as reações

ocorreram no interior de cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Os comprimentos de ondas foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm. O *software* utilizado foi o Luminous *Software* version 3.0.

3.9.3. Efeito de pH e Temperatura

O pH ótimo foi determinado avaliando a quantidade de fluorescência emitida pelo substrato após reação com enzima purificada em diferentes valores de pH, de 4,5 a 10,5 com incrementos de 0,5 unidades de pH. Os tampões utilizados foram acetato (pH 4,5 – 5,0); MES (pH 5,5 – 6,5); HEPES (pH 7,0 – 8,0); BICINE (8,5 – 9,0) e CAPS (pH 9,5 – 10,5), todos a 100 mM.

Foi utilizado o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, na concentração final de $2,2 \times 10^{-5}$ mM. A concentração final da enzima foi de 1,18 mM, o tampão utilizado foi o MES 100 mM, pH 5,5, em temperatura de 40°C.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pela incubação da enzima pura durante 60 minutos a 25°C nas faixas de pH (4,0-10,5) variando o pH com incrementos de 0,5 unidade. Em seguida quantificou-se a fluorescência emitida pelo substrato peptídico de supressão intramolecular, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, quando incubado com a enzima previamente exposta aos diferentes valores de pH. A concentração final de substrato foi de $2,2 \times 10^{-5}$ mM. A concentração final da enzima foi de 1,18 mM, o tampão utilizado foi o MES 100mM pH 6,0, pH ótimo obtido no ensaio anterior, em temperatura de 45°C.

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada de 30 a 80°C, com incrementos de 5°C, quantificando a fluorescência obtida após a reação da enzima pura com o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, sendo que a concentração final de substrato foi de $2,2 \times 10^{-5}$ mM e a de enzima foi de 1,18 mM, o tampão utilizado foi o MES 100mM pH 6,0.

3.9.4. Efeito de Íons e Inibidores

Para determinar o efeito de íons sobre a atividade proteolítica da enzima pura, foram preparadas soluções de: NaCl, ZnSO₄, CoCl₂, CuCl₂, CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂ e AlCl₃ a 100 mM (estoque).

Os inibidores testados foram PMSF, EDTA, ácido Iodoacético (AIA) e pepstatina a 100 mM (estoque), segundo protocolo descrito por Dunn (1989).

Em cada tubo de reação foi adicionado enzima pura e solução de cada íon ou inibidor, obtendo concentração final de 10 mM dos íons e inibidores. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 45 °C. Em seguida, foi realizada a avaliação da atividade proteolítica com o substrato de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, na concentração final de $2,2 \times 10^{-5}$ mM. A concentração final da enzima foi de 1,18 mM, o tampão utilizado foi o MES 100 mM pH 6,0, em temperatura de 45°C. As reações, as quais foram previamente incubadas com inibidores ou íons, foram comparadas com um controle, no qual nada foi adicionado.

3.10. Estudos de cinética enzimática

3.10.1. Determinação da concentração molar da enzima purificada

A concentração molar da enzima foi determinada por titulação do sítio ativo com o inibidor EDTA, conforme descrito por Klemencic et al. (2000) com modificações, sendo estimada em 200 nM, através de leitura em espectrofluorímetro modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific) utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em tampão MES 100 mM, pH 6,0 a 45°C. Os comprimentos de onda de fluorescência foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

3.10.2. Ensaios cinéticos com substrato sintético

A figura 5 mostra o modelo de Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da enzima é dividido em subsítios denominados S_3 , S_2 , S_1 , S_1' , S_2' e S_3' , sendo que, cada subsítio possui um resíduo de aminoácido correspondente no substrato. Modificações em uma determinada posição no substrato, fixando as outras, nos permite avaliar qual aminoácido interage melhor com cada subsítio, desta forma propiciando uma melhor eficiência catalítica da enzima.

Figura 5. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999).

Nos ensaios cinéticos foram estudadas variações de posicionamento dos aminoácidos que compõem o substrato, determinando a preferência de ancoragem da enzima conforme a distribuição dos aminoácidos no substrato peptídico. Essas variações de aminoácidos ocorreram em posições definidas como P_3 , P_2 , P_1 , P'_1 , P'_2 e P'_3 sendo representada no substrato da seguinte forma $Abz-P_3-P_2-P_1-P'_1-P'_2-P'_3-EDDnp$. Os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato $Abz-KLXSSKQ-EDDnp$ foram avaliados com variações em **X** nas posições mencionadas (P_1 , P_2 , P_3 , P'_1 , P'_2 e P'_3).

As cinéticas enzimáticas foram obtidas pela adição crescente de substrato na cubeta de reação. Os experimentos foram realizados em tampão MES 100mM pH 6,0 a 45°C e espectrofluorímetro, modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific), com controle de agitação e temperatura de reação utilizando o acessório Peltier 4-Position Fluorescence Cell Holder. Os comprimentos de onda foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

Os valores cinéticos de K_M e V_{max} foram obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten calculada por regressão não linear dos dados de hidrólise do substrato usando o programa Grafit versão 5.0. Foram estudados K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m determinando a preferência da enzima pelos diferentes substratos avaliados.

3.11. Microencapsulação

Para realizar o processo de microencapsulação, foi conduzido um bioprocesso em meio sólido nas melhores condições de tempo, temperatura e fonte de nitrogênio, o extrato obtido foi submetido à técnica de *spray drying* juntamente com adjuvante para a produção das micropartículas.

O aparelho de *spray dryer* utilizado foi o modelo MSD 0.5 (Labmaq do Brasil), que opera em modo concorrente, seu bico atomizador é de duplo fluído com orifício de saída de 1,2 mm. Os parâmetros utilizados para produção das micropartículas encontram-se na tabela 1.

A solução extrato:adjuvante ficou constantemente em agitação, com o auxílio de agitador magnético, o extrato foi bombeado para dentro do aparelho de *spray dryer*, em seguida passou pelo bico atomizador, formando as micropartículas, em seguida encontrou com ar quente na câmara de secagem, propiciando a diminuição da umidade das partículas, e por último o pó foi coletado.

Tabela 1. Parâmetros do Aparelho de *Spray Dryer* ajustados para secagem e microencapsulação da peptidase obtida por bioprocesso em meio sólido (90%(m/m) de farelo de trigo + 10%(m/m) de albumina a 30°C durante 72 horas) pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.

Parâmetros	Valores
Vazão de alimentação	Variável
Vazão do ar de secagem	2,75 m ³ /min
Vazão do ar do bico	50 L/min
Pressão do ar do bico	4,5 kgf/cm ²
Temperatura de saída de secagem	Variável

Inicialmente foi realizado um pré-estudo para avaliar a necessidade ou não de um adjuvante e qual este seria, a avaliação foi conduzida produzindo as micropartículas apenas com o extrato bruto (EB) e EB + adjuvante (Ad) na proporção de 1:1, sendo os adjuvantes utilizados, manitol, maltodextrina e dióxido de silício coloidal (Aerosil®). O adjuvante que apresentou o melhor rendimento e preservação da atividade proteolítica da peptidase, após o processo, foi utilizado para o delineamento Box-Behnken – ferramenta de planejamento experimental para otimização de resultados, no qual são utilizados três fatores variáveis, cada um com 3 variações, os quais são combinados entre si em 15 experimentos diferentes. No

presente estudo foram utilizados os seguintes fatores: proporção EB/Ad, temperatura e vazão de alimentação (VA) (tabela 2).

A análise estatística do delineamento Box-Behnken foi realizada utilizando o *software* Statistica release 7.

O rendimento foi calculado pesando os frascos utilizados para coletar o pó antes do processo e após a coleta do pó, a diferença entre os pesos foi a quantidade de pó obtida, em seguida, o valor obtido foi dividido pela quantidade de sólidos inicial de cada proporção extrato:adjuvante e multiplicados por 100. A quantidade de pó de sólidos de cada proporção foi de 1,2, 1,6 e 2,4g e teor de sólidos 1,2, 1,6 e 2,4% para 0,5:1, 1:1 e 1,5:1, respectivamente.

Tabela 2. Desenho experimental para microencapsulação do extrato enzimático produzido pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em bioprocesso em meio sólido.

Experimento	Níveis fatoriais codificados			Níveis fatoriais não codificados		
	T (°C)	VA(mL/min)	EB/Ad	T (°C)	VA(mL/min)	EB/Ad
1	-1	-1	0	50	3	1
2	+1	-1	0	100	3	1
3	-1	+1	0	50	9	1
4	+1	+1	0	100	9	1
5	0	0	0	75	6	1
6	0	0	0	75	6	1
7	0	0	0	75	6	1
8	-1	0	-1	50	6	0,5
9	+1	0	-1	100	6	0,5
10	0	-1	-1	75	3	0,5
11	0	+1	-1	75	9	0,5
12	-1	0	+1	50	6	1,5
13	+1	0	+1	100	6	1,5
14	0	-1	+1	75	3	1,5
15	0	+1	+1	75	9	1,5

3.11.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As características morfológicas das micropartículas foram observadas por MEV, utilizando um microscópio SS-550 (Shimadzu, Japão). Antes de serem submetidas à análise, as amostras foram revestidas com ouro sob uma atmosfera de argônio, utilizando um revestidor Bal-Tec SCD 050 (Fürstentum Liechtenstein). As fotomicrografias foram efetuadas a uma voltagem de aceleração de 20,0 kV.

3.11.2. Estabilidade das micropartículas

A avaliação da estabilidade das peptidases nas micropartículas produzidas através da técnica de *spray drying* foi realizada com a exposição às temperaturas de 4°C ou 25°C, durante os seguintes períodos de dias 0, 15, 30, 60, 90 e 180. Os pós foram alíquotados de forma ideal para cada ensaio, eles foram armazenados em tubos de polipropileno de 2mL, devidamente lacrado. Além disso, o extrato utilizado para o processo também foi submetido às mesmas condições, com o objetivo de avaliar a estabilidade das micropartículas frente ao extrato bruto e frente ao tempo de armazenamento. Para isso, passado os dias que haviam sido determinados para a avaliação, as micropartículas foram ressuspensas, mantendo a concentração inicial, ou seja, do extrato bruto, e foram submetidas ao ensaio de avaliação de atividade proteolítica conforme o item 3.6 e quantificação das proteínas totais conforme descrito por Bradford (1976).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Bioprocessos em meio submerso

A produção de peptidases por fungos filamentosos pode ser induzida ou não com adição de fonte suplementar proteínas. O fungo *Eupenicillium javanicum* apresentou repressão com a adição de caseína no bioprocessos submerso. O aumento da concentração desta fonte de N₂ (proteico) promoveu uma modulação negativa, ou seja, diminuição da produção de peptidase. O pico de produção foi em 144 horas com 30U/mL na presença de 0,25% de caseína, figura 6. Outros trabalhos mostraram influência da adição de caseína na produção de peptidases por fungos em bioprocessos submersos, segundo Yegin et al. (2010), a adição de 0,5% de caseína promoveu aumento na produção de peptidase pelo fungo *Mucor mucedo* DSM 809.

Figura 6. Influência da concentração de caseína como fonte de nitrogênio, no bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, para produção de peptidases em pH 6,0, incubado a 30°C e 120 rpm.

O fungo *Eupenicillium javanicum* apresentou um aumento na produção de peptidases, quando exposto a 0,5% de glicose em comparação com o controle (sem glicose), tabela 3. O bioprocesso realizado com meio suplementado com glicose, frutose e sacarose, indicou que a adição de 0,5% de glicose promoveu aumento na produção de peptidase de 37% quando comparado com o bioprocesso sem adição de fonte de carbono.

A adição de fonte de carbono no bioprocesso submerso pode causar repressão catabólica, como observado na presença de sacarose, pois com aumento da porcentagem de sacarose ocorreu uma diminuição da produção de peptidase. A repressão catabólica na presença de fonte de carbono também foi observada por Abidi, et al. (2008), em seu trabalho a adição de glicose, em meio submerso, promoveu diminuição na produção de peptidase pelo fungo *Botrytis cinérea*. Foi observado que o fungo *Aspergillus awamori* MTCC apresentou maior produção de peptidases ácida quando o meio do bioprocesso foi suplementado com glicose, e com a adição de outras fontes de carbono, houve uma diminuição na produção de peptidases (SINHA; SINHA, 2009).

Tabela 3. Influência da fonte de carbono no bioprocesso submerso para produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, com meio suplementado com 0,5% de caseína, em pH 6,0, incubado a 30°C e 120 rpm.

Fonte de Carbono	Concentração (%)	Atividade Enzimática (U/mL)
Controle	-	19,05 ± 1,00
Frutose	0,1	15,86 ± 0,98
Frutose	0,5	18,35 ± 1,27
Frutose	1,0	18,35 ± 1,36
Glicose	0,1	16,39 ± 1,76
Glicose	0,5	26,28 ± 1,84
Glicose	1,0	16,18 ± 1,00
Sacarose	0,1	18,25 ± 0,88
Sacarose	0,5	10,32 ± 0,28
Sacarose	1,0	12,00 ± 0,18

A avaliação do efeito dos diferentes valores de pH na produção de peptidase pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em bioprocesso submerso mostrou a influência da concentração de próton, ou seja, quanto mais ácido o meio maior a produção de peptidases. Foi observado que em pH 5,0 ocorreu maior produção de peptidase. Com o aumento do pH no bioprocesso submerso, o fungo *Eupenicillium javanicum* respondeu com baixa produção de peptidase, indicando que a baixa concentração de prótons no meio fermentativo leva a uma diminuição da produção de peptidases (figura 7). Segundo Sandhya et al. (2005), o fungo *Aspergillus oryzae* apresentou menor produção de peptidases com o aumento do pH, corroborando que o pH tem grande influência sobre a produção de peptidase, semelhante ao que ocorreu na produção de peptidase pelo *Eupenicillium javanicum*.

Figura 7. Influência da concentração de prótons (pH) na produção de peptidase pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. O meio foi suplementado com 0,25% de caseína, incubado a 30 °C e 120 rpm.

A influência da temperatura no bioprocesso submerso para produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* revelou que o fungo em questão não respondeu bem a produção de peptidases com o aumento da temperatura.. A figura 8 mostra que, com o aumento da temperatura há uma queda na produção de peptidases. Em 30°C foi observado maior produção de peptidases e em 35°C ocorreu uma pequena queda na produção. Já em temperaturas superiores (40 e 45°C) não foi detectada a produção de peptidase e nem observado crescimento do micro-organismo, sugerindo que o fungo pertence à classe dos mesofílicos. Segundo Joo e Chang (2005), os resultados de otimização da produção de peptidase por *Bacillus* sp. I-312, o aumento da temperatura de incubação também promoveu diminuição na produção de peptidase, mostrando a importância do controle da temperatura no bioprocesso submerso para produção de peptidases.

A produção máxima de peptidase pelo fungo *Eupenicillium javanicum* foi de 45U/mL em 96 horas de bioprocesso nas melhores condições, ou seja, meio suplementado com 0,25% de caseína, pH 5,0 e temperatura de incubação 30°C.

Figura 8. Influência da temperatura no bioprocesso submerso do fungo *Eupenicillium javanicum*, para produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em pH 5,0 e meio suplementado com 0,25% de caseína a 120 rpm.

4.2. Bioprocessos em meio sólido

Os estudos realizados com os resíduos agroindustriais, farelo de trigo (FT) e farelo de algodão (FA), mostraram que, a melhor produção de peptidases foi quando utilizamos somente FT. Foi observado um pico máximo de produção em 96 horas com 99U/mL (figura 9), mostrando a importância da escolha do resíduo agroindustrial no bioprocesso. O farelo de trigo apresenta em sua composição 18%

de proteínas (MADRUGA; CAMARA, 2000) além de sua porosidade que facilitam a dispersão micelial (SANDHYA et al., 2005; PANDEY, 2003).

Figura 9. Influência dos resíduos agroindustriais, FT e FA, na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, mantido a 30 °C.

O estudo realizado com as diferentes concentrações de albumina, em meio de bioprocessamento sólido, mostrou uma melhor produção de peptidases quando o meio foi suplementado com 10% e 20% de albumina quando comparado com o meio sem suplementação. A adição de albumina modulou positivamente, em cerca de 10%, a produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. Foi obtido um pico de produção em 72 horas de bioprocessamento com 110 U/mL, o resultado pode ser observado na figura 10.

Figura 10. Influência da concentração de albumina, em bioprocessamento sólido, para produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, utilizando farelo de trigo como meio, incubando a 30°C.

O estudo realizado com as diferentes concentrações de caseína, em meio de bioprocessamento sólido, mostrou que com a diminuição da concentração de caseína no meio, houve um aumento da produção de peptidases. Comparando o meio sem

caseína com o meio suplementado com 10% de caseína, não foi observado diferença estatística entre as produções, mostrando assim, desnecessário a suplementação do meio com caseína para a produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* (figura 11).

Figura 11. Influência da concentração de caseína em bioprocesso sólido para produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, utilizando farelo de trigo como meio incubando a 30°C.

Os estudos realizados para verificação de temperatura ótima de produção de peptidases revelou que o fungo é sensível ao aumento da temperatura do bioprocesso, com o aumento da temperatura observamos uma diminuição na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em bioprocesso sólido, sendo que em temperaturas acima de 35°C (40 e 45°C) não foi detectada a produção de peptidase, isto mostra a importância do controle da temperatura de incubação em bioprocessos.

O pico de produção foi quando o bioprocesso foi incubado a 30°C, com suplementação de 10% de albumina no farelo de trigo, com 72 horas de incubação. A produção de peptidase foi a máxima com 110U/mL, o resultado pode ser observado na figura 12.

Altas temperaturas podem influenciar negativamente a atividade metabólica dos micro-organismos e podem inibir o crescimento dos mesmos, em geral, peptidases são termolábeis e apresentam menor atividade em temperaturas elevadas (HAQ et al., 2006).

Figura 12. Influência da temperatura na produção de peptidases pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em meio contendo 90% de farelo de trigo e 10% de albumina, quando incubado em diferentes temperaturas.

4.3. Caracterização bioquímica parcial dos extratos dos bioprocessos submerso e sólido

Foi realizado neste trabalho a otimização dos parâmetros reacionais essenciais a performance catalítica das peptidases dos extratos brutos de ambos os bioprocessos. Foram investigados os seguintes parâmetros: efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase e efeito de íons metálicos e inibidores, visto que estes parâmetros exercem grande influência na atividade das peptidases.

Quanto ao efeito de pH sobre a atividade das peptidase, observou-se que a melhor atividade proteolítica para os extratos provenientes da BES e BSM, foi em pH 5,5. No BSM, figura 13a, pode-se observar que além do pico em pH 5,5 foram observados picos no pH 8,0 e 10,0, ambos com atividade inferior ao pH 5,5, indicando uma possível presença de outras duas peptidases de características alcalinas. Na figura 13b, só foi observado um pico de atividade em pH 5,5. Este único pico de pH, sugere a presença de uma única peptidase neste extrato (BES), e que esta peptidase pode ser semelhante à encontrada no extrato do BSM.

Figura 13. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade das peptidases, produzidas por fermentação submersa (a) e sólida (b), pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína a 40°C.

O ensaio enzimático, em diferentes temperaturas de incubação, mostrou que a temperatura ótima da atividade da peptidase, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, nos dois tipos de bioprocessos, foi de 60°C. Acima desta temperatura observou-se uma queda de atividade proteolítica (figura 14a e 14b), o que está envolvida ao desnovelamento ou desnaturação pela temperatura, o que ocasiona a queda da atividade. *Rhizopus oryzae* foi submetido a um bioprocessos sólido, e produziu peptidases com pH e temperatura ótima semelhante ao da enzima produzida no presente trabalho (KUMAR *et al*, 2005), resultados semelhantes foram observados, em peptidases produzidas por *Thermoascus aurantianus* (MERHEB *et al*, 2007).

Figura 14. Influência da temperatura na atividade proteolítica de peptidase, produzidas por fermentação submersa (a) e sólida (b), pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 5,5.

O ensaio enzimático, com a adição de diferentes íons, mostrou que alguns íons podem influenciar positivamente na atividade proteolítica e outros negativamente, eles podem se ligar em resíduos de aminoácidos e influenciar na estrutura da proteína, consequentemente influenciando na atividade proteolítica (MERHEB-DINI et al., 2009).

A adição de cloreto de cobalto e sulfato de zinco aumentou a atividade enzimática das peptidases encontradas nos bioprocessos submerso e sólido, em 87 e 12%, e 40 e 46%, respectivamente. O sulfato ferroso e sulfato de níquel inibiram significativamente a atividade proteolítica em ensaio com enzima produzida em BSM, em 30% e 31%, respectivamente. Enzimas produzidas em BES obtiveram ativação quando adicionado cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de alumínio e cloreto de cálcio e inibição na presença de cloreto de cobre. Os resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Influência de íons sobre a atividade das peptidases produzidas por bioprocessos submerso (BSM) e bioprocessos sólido (BES) pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com o substrato azocaseína a 40°C em tampão MES pH 5,5, com concentração final de íons de 10 mM.

Íons	BSM	BES
	Atividade proteolítica residual (%)	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100 ± 3,64	100 ± 4,89
CoCl₂	187 ± 3,42	140 ± 7,41
LiCl	102 ± 2,55	99 ± 8,32
MgCl₂	99 ± 0,70	122 ± 4,53
KCl	96 ± 2,85	121 ± 2,44
Fe₂(SO₄)₃	95 ± 1,13	101 ± 8,54
ZnSO₄	112 ± 2,33	146 ± 1,62
FeSO₄	70 ± 3,97	100 ± 2,97
NiSO₄	69 ± 2,66	91 ± 3,70
CuCl₂	91 ± 3,99	55 ± 2,82
CaCl₂	95 ± 1,00	131 ± 5,56
MnCl₂	99 ± 0,38	98 ± 3,58
AlCl₃	107 ± 6,96	124 ± 1,62
BaCl₂	100 ± 2,52	114 ± 1,66
NaCl	109 ± 2,72	91 ± 2,11

O ensaio enzimático, com inibidores, é utilizado para determinar a subclasse das peptidases, de acordo com o mecanismo de ação catalítica. Na presença de EDTA ocorreu uma inibição de cerca de 33 % da peptidase obtida do BSM e 55 %

da peptidase proveniente da BES (tabela 5), sugerindo que ambas podem ser metalopeptidases. Em geral, esta subclasse de enzima apresenta pH ótimo próximo ao neutro, porém, em outros trabalhos, foi observado produção, por micro-organismos, de metalopeptidases com pH ótimo ácido, incluindo, o *Thermoascus aurantianus* (MERHEB *et al*, 2009) e *Streptomyces septatus* TH-2 (HATANAKA *et al.*, 2005).

Tabela 5. Influência da adição de inibidores, na atividade proteolítica de peptidases obtidas do bioprocessamento submerso (BSM) e bioprocessamento sólido (BES), pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,5, com concentração final de inibidores de 10 mM.

Inibidor	BSM	BES
	Atividade proteolítica residual (%)	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100 ± 3,97	100 ± 1,33
PMSF	97 ± 6,45	88 ± 1,47
Ácido iodoacético	98 ± 4,95	99 ± 0,49
EDTA	67 ± 6,83	45 ± 3,60

A estabilidade da peptidase, frente à exposição a diferentes valores de pH, revelou que a enzima, produto do BSM e BES, apresenta maior estabilidade em valores de pH ácidos mantendo a estabilidade (por volta de 80%) em pH neutro e alcalino. Quanto mais próximo do pH alcalino, a estabilidade mostra uma tendência em diminuir, mais pronunciado no BSM (figura 15a) do que no BES (figura 15b). A peptidase ácida, produzida pelo fungo *Aspergillus niger* I1, apresentou maior estabilidade, próximo ao seu pH ótimo, e a estabilidade diminuiu, com a exposição da enzima, frente à valores de pH, distantes do seu pH ótimo (3,0) (SIALA *et al.*, 2009). Entretanto, a queda da atividade quando exposta a variação de pH, indica que a peptidase obtida pelos dois bioprocessos pode ser empregada em sistemas onde a variação de pH é brusca e ampla, pois a queda aproximou-se de 20%, mostrando a importância da peptidase aqui produzida.

Figura 15. Estabilidade da peptidase frente a variação de pH, obtidas pelo bioprocesso submerso (a) e sólido (b) pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição ao pH, com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,5, durante 60 minutos.

A estabilidade da peptidase, frente à exposição a variações de temperatura em função do tempo, revelou que a enzima do BSM e do BES, quando expostas a temperaturas abaixo de 50°C por 60 minutos, mantêm mais de 50 % de sua atividade. Quando esta temperatura aumenta para 50°C, as enzimas de ambos os bioprocessos mantiveram cerca de 50% da atividade quando exposta em 60 minutos (figura 16).

Quando aumentamos a temperatura para 60°C, a peptidase proveniente do bioprocesso submerso, mostrou-se mais estável que a do bioprocesso sólido (figura 16). Peptidases ácidas, produzidas pelo fungo *Aspergillus niger* I1, manteve aproximadamente 30% de sua atividade, após 15 minutos, quando exposta a 50°C (SIALA *et al*, 2009). Assim, entendemos que a peptidase do presente estudo apresenta melhor estabilidade que outras peptidases já citadas.

Figura 16. Estabilidade da peptidase frente à exposição a variação da temperatura em função do tempo, obtidas pelos bioprocessos submerso (a) e sólido (b), determinada com substrato azocaseína a 40°C, em tampão MES pH 5,0.

4.4. Purificação

O produto oriundo do BES foi precipitado em etanol na proporção de 1:2 (EB:etanol 92,6 °GL). As etapas de purificação estão descritas na tabela 6. A purificação da peptidase foi realizada em três etapas, obtendo rendimento final de 5,6%, e purificação de 10,8 vezes. O processo de purificação apresentou reprodutibilidade e mostrou-se bastante viável, pois com a utilização de dois sistemas cromatográficos, filtração em gel e troca iônica, chegamos a sua forma pura ou homogênea.

Tabela 6. Etapas de purificação da peptidase, produzida em bioprocesso em estado sólido, pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.

Etapas	Atividade Total (U)	Proteína Total (mg)	Atividade Específica U/mg	Recuperação (%)	Purificação (vezes)
Extrato Bruto	251364	47521	5290	100,0	1,0
Precipitação	104979	257305	4560	41,8	0,9
Sephadex G-50	80567	1072	30005	32,1	5,7
Troca Iônica	14154	4265	56885	5,6	10,8

O material, proveniente da precipitação em etanol, foi submetido à cromatografia de filtração em gel em resina sephadex G-50. O perfil de eluição mostrou 3 picos protéicos, porém, somente o pico II apresentou atividade proteolítica (figura 17), antes de iniciar o cromatograma foram coletados 18 frações de 5 mL.. Este pico foi dialisado e submetido à cromatografia de troca iônica em resina aniônica (Q-resource) (figura 18), antes de iniciar o cromatograma foram coletados 10 frações de 5 mL.

O perfil de eluição da cromatografia de troca iônica apresentou 3 picos protéicos, somente o pico I apresentou atividade proteolítica.

Este pico foi submetido à eletroforese SDS-PAGE a 12% para determinar o grau de pureza (figura 19).

Figura 17. Perfil de eluição das proteínas contidas no precipitado do bioprocesso sólido, utilizando a resina sephadex G-50. A eluição foi utilizando tampão acetato 50 mM pH 5,5. O fluxo foi de 0,62 mL/min, e frações com 5mL.

Figura 18. Perfil de eluição das proteínas contidas no isolado com atividade proteolítica eluído da cromatografia sephadex G-50. Foi utilizada a resina aniônica (Q-resource), com o gradiente salino de 0 a 1 M de NaCl em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Para a eluição das proteínas. O fluxo foi mantido em 4 mL/min e foram coletadas frações de 2 mL.

Analisando a figura 19, podemos observar que a peptidase encontra-se pura, e a determinação da massa molecular foi estimada em 30 kDa, após análise do gel pelo *software* ImageLab comparando com o marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare). Assim podemos concluir que o processo de purificação da peptidase, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* no bioprocesso sólido, é viável e eficiente.

Figura 19. Gel SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata das etapas de produção da peptidase pelo fungo *E. javanicum* (a) marcador de baixa massa molecular e (b) peptidase purificada pela cromatografia de troca iônica em resina aniônica (Q-resource).

4.5. Ensaios de caracterização bioquímica funcional

Quanto ao efeito de pH sobre a atividade da peptidase, observou-se que a melhor atividade proteolítica da enzima purificada, produzida por bioprocessamento sólido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, foi entre os valores de pH 5,5 e 6,5 (figura 20). Hatanaka et al. (2005) também observaram a produção de metalopeptidases com maior atividade proteolítica em faixa de pH próxima a esta, a enzima foi produzida pelo micro-organismo *Streptomyces septatus* TH-2 sob bioprocessamento submerso. Merheb-Dini et al (2009) também obtiveram resultados semelhantes com metalopeptidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* sob bioprocessamento sólido.

Figura 20. Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica de peptidases purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C.

O ensaio enzimático, em diferentes temperaturas de incubação, mostrou que a temperatura ótima da peptidase purificada, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* por bioprocessamento sólido, foi de 70°C.

Após esta temperatura foi observado uma queda de atividade proteolítica (figura 21). Merheb-Dini et al (2009) encontraram uma metalopeptidase produzida pelo fungo *Thermoascus aurantiacus* com temperatura ótima semelhante.

Figura 21. Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,0.

O ensaio enzimático com a incubação prévia da enzima pura com diferentes íons metálicos, produzida por bioprocessamento sólido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, revelou que alguns íons influenciam positivamente a atividade da peptidase, ou seja, promovem o aumento da atividade quando comparado com o controle.

A adição dos íons sódio, bário e cobalto promoveram aumento na atividade proteolítica da enzima em 52%, na presença do sódio e 24% quando exposta ao bário e cobalto. A adição de cálcio, magnésio e cobre, praticamente manteve a atividade enzimática da peptidase, enquanto que, a adição de zinco e alumínio influenciou negativamente na atividade proteolítica da enzima levando a perda de 16% de sua atividade original. Os resultados podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7. Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica de peptidase produzida em bioprocesso sólido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. O ensaio foi determinado na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,0, a concentração final dos íons foi de 10 mM.

Íons	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100 ± 12,74
NaCl	152 ± 10,94
BaCl₂	124 ± 12,21
CoCl₂	124 ± 3,92
CuCl₂	98 ± 3,43
MgCl₂	96 ± 2,13
CaCl₂	94 ± 6,32
AlCl₃	84 ± 12,39
ZnSO₄	84 ± 6,32

A produção de metalopeptidase através do bioprocesso em meio sólido também foi observada por Saxena e Singh (2011), o micro-organismo utilizado foi *Bacillus* sp., e a enzima produzida também mostrou aumento na atividade proteolítica após ser pré incubado com sódio.

O ensaio enzimático da enzima pura, com a incubação prévia com inibidores confirmou o que já tinha sido observado com a enzima não pura, a adição de EDTA inibe a atividade proteolítica da peptidase, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* obtida do bioprocesso sólido.

Foi observado uma inibição de cerca de 69 % da atividade proteolítica da enzima pura na presença do EDTA (tabela 8). Assim, como o EDTA é um agente quelante e a atividade proteolítica das metalopeptidases está intimamente relacionada com a presença de íons metálicos que podem estar relacionados diretamente com o sítio catalítico ou à sua estrutura, sugere-se que a enzima em questão pertence à classe das metalopeptidase.

Tabela 8. Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica de peptidases produzidas em bioprocesso semisólido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. A atividade proteolítica determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, em pH 6,0, a concentração final dos inibidores foi de 10 mM.

Inibidores	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100 ± 4,80
EDTA	31 ± 0,84
PMSF	70 ± 1,55
AIA	73 ± 5,86
PEPSTATINA	80 ± 4,89

A estabilidade da peptidase purificada, produzida por bioprocesso sólido pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes valores de pH, revelou que a enzima, apresenta maior estabilidade em valores de pH ácidos e próximos ao neutro, mantendo acima de 60% da atividade até o pH 10, sendo que acima desse pH a enzima consegue manter apenas 10% de sua atividade proteolítica (figura 22). A enzima purificada mostrou ser menos estável que a enzima não purificada, isso pode ser explicado pela presença de algumas substâncias que juntamente com a enzima, mantém a estabilidade da mesma frente à variação de pH.

Figura 22. Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Eupenicillium javanicum*, frente à exposição a diferentes valores de pH. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 45°C, pH 6,0.

4.6. Estudos de cinética enzimática

A tabela 9 mostra a eficiência catalítica da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum* em relação à substituição dos aminoácidos na posição P₁ no substrato Abz-KLXSSKQ-EDDnp. Analisando os dados, podemos observar que na posição P₁ não ocorre a hidrólise dos aminoácidos ácido glutâmico, glicina, isoleucina, lisina, prolina, serina e triptofano, porém os aminoácidos arginina, fenilalanina e metionina, foram os que propiciaram maior eficiência catalítica 2200, 2100 e 1800 $\mu\text{M}^{-1}.\text{seg}^{-1}$, ou seja, esses aminoácidos influenciaram positivamente na clivagem do substrato pela enzima. Os três aminoácidos em questão, apresentam

como semelhança o caráter apolar, o que significa que este subsítio apresenta preferências por subsítios apolares de cadeias longas e aromáticas. A substituição de alguns aminoácidos, na posição P_1 , não permitiu a clivagem do substrato pela peptidase, mostrando assim que a enzima apresenta certa especificidade quando se trata do tipo de aminoácido na posição P_1 do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S_1 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_1 , nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	$k_{cat}(s)$	$K_M(\mu M) \times 10^{-3}$	$k_{cat}/K_M(s^{-1} \cdot \mu M^{-1})$
** Abz-KLESSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLGSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLISSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
**** Abz-KLKSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLPSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
*** Abz-KLSSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLWSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLVSSKQ-EDDnp	0,005	0,021	200
*** Abz-KLQSSKQ-EDDnp	0,014	0,001	300
* Abz-KLASSKQ-EDDnp	0,007	0,019	400
**** Abz-KLHSSKQ-EDDnp	0,003	0,007	400
*** Abz-KLYSSKQ-EDDnp	0,004	0,010	500
* Abz-KLMSSKQ-EDDnp	0,013	0,007	1800
* Abz-KLFSSKQ-EDDnp	0,043	0,021	2100
* Abz-KLRSSKQ-EDDnp	0,028	0,013	2200

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

A tabela 10 mostra os valores dos parâmetros cinéticos no subsítio S_2 da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* em relação à substituição dos aminoácidos na posição P_2 do substrato Abz-KXRSSKQ-EDDnp. Analisando os dados, podemos observar que o subsítio S_2 aceita os substratos contendo os aminoácidos valina, arginina, isoleucina, metionina, tirosina, nesta posição. Os valores da eficiência catalítica foram 2200, 1900, 1700, 1700 e 1700 $s^{-1} \cdot \mu M^{-1}$, respectivamente. Este subsítio é generalista, aceita substratos apolares e polares. A enzima mostrou maior afinidade pela valina (apolar). Os substratos que propiciaram maior eficiência catalítica, em sua maioria, têm como semelhança o resíduo de aminoácido apolar, na posição P_2 , porém a arginina apresenta o caráter polar básico e a tirosina, polar neutro. A substituição de alguns aminoácidos, na posição P_2 , não permitiu a clivagem do substrato pela peptidase, mostrando assim que a enzima

apresenta certa especificidade quando se trata do tipo de aminoácido na posição P₂ do substrato Abz-KXRSSKQ-EDDnp.

Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S₂, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₂, nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ . μM ⁻¹)
* Abz-KGRSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
**** Abz-KHRSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
*** Abz-KQRSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KWRSSKQ-EDDnp	0,000	0,000	0
** Abz-KERSSKQ-EDDnp	0,004	0,020	200
*** Abz-KSRSSKQ-EDDnp	0,011	0,031	400
* Abz-KARSSKQ-EDDnp	0,028	0,187	500
* Abz-KPRSSKQ-EDDnp	0,020	0,033	600
* Abz-KFRSSKQ-EDDnp	0,008	0,012	700
**** Abz-KKRSSKQ-EDDnp	0,059	0,039	1500
*** Abz-KYRSSKQ-EDDnp	0,043	0,026	1700
* Abz-KMRSSKQ-EDDnp	0,036	0,021	1700
* Abz-KIRSSKQ-EDDnp	0,050	0,029	1700
**** Abz-KRRSSKQ-EDDnp	0,041	0,022	1900
* Abz-KVRSSKQ-EDDnp	0,036	0,017	2200

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

A tabela 11 informa os parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* em relação à substituições nos resíduos de aminoácidos correspondentes ao subsítio S₃ do substrato Abz-XLRSSKQ-EDDnp. Analisando os dados, podemos observar que a presença dos aminoácidos: valina, isoleucina e alanina na posição P₃, do substrato, foram os que propiciaram maiores valores de eficiência catalítica, de 4400, 4000 e 2800 s⁻¹.μM⁻¹, respectivamente. A enzima mostrou maior afinidade pela valina. Os resíduos de aminoácidos, na posição P₃, que propiciaram maior eficiência catalítica, têm como semelhança o caráter apolar. Diferente do que ocorreu na posição P₁ e na posição P₂, todos os resíduos de aminoácidos na posição P₃ permitiram a clivagem do substrato, mostrando assim uma menor especificidade da enzima em relação ao tipo de aminoácido na posição P₃, quando comparado com as posições P₁ e P₂. De maneira geral, os aminoácidos de caráter apolar foram os que mais influenciaram na eficiência catalítica da enzima, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, analisando substituições de aminoácidos nas posições P₁, P₂ e P₃, indicando que estes subsítios apresentam

características apolares. O subsítio S₃ apresentou os maiores valores de eficiência catalítica, indicando que este subsítio influencia na hidrólise dos substratos.

Tabela 11. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S₃, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₃, nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ . μM ⁻¹)
* Abz-WLRSSKQ-EDDnp	0,004	0,013	300
*** Abz-SLRSSKQ-EDDnp	0,010	0,018	600
** Abz-ELRSSKQ-EDDnp	0,029	0,043	700
* Abz-FLRSSKQ-EDDnp	0,014	0,018	800
*** Abz-YLRSSKQ-EDDnp	0,013	0,014	1000
*** Abz-QLRSSKQ-EDDnp	0,021	0,019	1100
* Abz-MLRSSKQ-EDDnp	0,012	0,010	1200
* Abz-GLRSSKQ-EDDnp	0,018	0,015	1300
**** Abz-HLRSSKQ-EDDnp	0,027	0,021	1300
**** Abz-RLRSSKQ-EDDnp	0,019	0,013	1500
* Abz-ALRSSKQ-EDDnp	0,037	0,013	2800
* Abz-ILRSSKQ-EDDnp	0,043	0,011	4000
* Abz-VLRSSKQ-EDDnp	0,045	0,010	4400

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

Na tabela 12, temos os valores dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* em relação aos substratos com substituição em P₁'. Analisando os dados, podemos observar que o substrato contendo a tirosina em P₁' foi o que mais sofreu hidrólise, com valor de 92700 s⁻¹. μM⁻¹, seguido de arginina com 20300 s⁻¹. μM⁻¹ e lisina com 14800 s⁻¹. μM⁻¹, ambos os substratos são considerados polares, mas também foi observado que houve hidrólise com a metionina (apolar) na posição P₁' com 14300 s⁻¹. μM⁻¹. Os substratos avaliados apresentam hidrólise pela peptidase mostrando assim uma menor especificidade.

Tabela 12. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S₁, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₁, nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ · μM ⁻¹)
* Abz-KLRGSKQ-EDDnp	0,006	0,017	300
*** Abz-KLRQSKQ-EDDnp	0,014	0,011	1300
* Abz-KLRPSKQ-EDDnp	0,026	0,019	1400
** Abz-KLRESKQ-EDDnp	0,045	0,027	1600
* Abz-KLRVSKQ-EDDnp	0,063	0,023	2800
* Abz-KLRASKQ-EDDnp	0,142	0,022	6300
* Abz-KLRISKQ-EDDnp	0,160	0,022	7200
**** Abz-KLRHSKQ-EDDnp	0,117	0,016	7300
* Abz-KLRFSKQ-EDDnp	0,072	0,008	9400
* Abz-KLRMSKQ-EDDnp	0,460	0,032	14300
**** Abz-KLRKSKQ-EDDnp	0,119	0,008	14800
**** Abz-KLRRSKQ-EDDnp	0,132	0,007	20300
*** Abz-KLRYSKQ-EDDnp	0,615	0,007	92700

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

A tabela 13 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum*. Analisando os dados, podemos observar que o substrato contendo isoleucina na posição P₂, propiciou maior eficiência catalítica com 15700 s⁻¹ · μM⁻¹, esse subsítio alterna entre substratos apolares e polares, sendo assim, inespecífico.

Tabela 13. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S₂, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₂, nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ · μM ⁻¹)
* Abz-KLRSPKQ-EDDnp	0,005	0,026	200
* Abz-KLRSGKQ-EDDnp	0,011	0,022	500
* Abz-KLRSEKQ-EDDnp	0,015	0,018	900
** Abz-KLRSEKQ-EDDnp	0,009	0,010	1000
* Abz-KLRSMKQ-EDDnp	0,060	0,007	1000
* Abz-KLRSWKQ-EDDnp	0,015	0,013	1200
**** Abz-KLRSHKQ-EDDnp	0,018	0,009	2000
**** Abz-KLRSLKQ-EDDnp	0,028	0,011	2400
*** Abz-KLRSQKQ-EDDnp	0,041	0,011	3700
* Abz-KLRSVKQ-EDDnp	0,041	0,010	4100
* Abz-KLRSAKQ-EDDnp	0,055	0,012	4700
*** Abz-KLRSYKQ-EDDnp	0,024	0,003	8600
**** Abz-KLRSRKQ-EDDnp	0,052	0,005	10800
* Abz-KLRSIKQ-EDDnp	0,041	0,003	15700

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

A tabela 14 apresenta os valores dos parâmetros cinéticos do substrato da peptidase purificada do fungo do *Eupenicillium javanicum*. Analisando os dados, podemos observar que na posição P_{3'} o substrato que propiciou maior eficiência catalítica contem tirosina e fenilalanina, com 3600 e 2200 s⁻¹. μM⁻¹, respectivamente. A tirosina e fenilalanina apresentam como semelhança a presença de anel aromático em sua estrutura, porém diferem na característica química em polar e apolar, respectivamente. Alguns dos aminoácidos substituídos na posição P_{3'} não apresentaram clivagem do substrato.

Tabela 14. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Eupenicillium javanicum* do subsítio S_{3'}, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_{3'}, nas condições de ensaio a 45 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ . μM ⁻¹)
**Abz-KLRSSSEQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLRSSGQ-EDDnp	0,000	0,000	0
**** Abz-KLRSSHQ-EDDnp	0,000	0,000	0
* Abz-KLRSSPQ-EDDnp	0,000	0,000	0
*** Abz-KLRSSQQ-EDDnp	0,000	0,000	0
*** Abz-KLRSSSQ-EDDnp	0,004	0,018	200
* Abz-KLRSSAQ-EDDnp	0,010	0,026	400
* Abz-KLRSSWQ-EDDnp	0,013	0,020	700
* Abz-KLRSSVQ-EDDnp	0,017	0,019	900
**** Abz-KLRSSRQ-EDDnp	0,027	0,018	1600
* Abz-KLRSSIQ-EDDnp	0,013	0,008	1600
* Abz-KLRSSFQ-EDDnp	0,027	0,013	2200
*** Abz-KLRSSYQ-EDDnp	0,023	0,006	3600

*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico

O lado “linha” do sítio catalítico apresentou os maiores valores de eficiência catalítica, indicando que este subsítio é responsável pela catálise da peptidase.

4.7. Microencapsulação

A tabela 15 mostra o percentual de rendimento do processo de microencapsulação da peptidase. Como podemos observar os experimentos 2, 3 e 4 foram os que apresentaram os melhores rendimentos 63,12; 66,12 e 61%, respectivamente.

Os menores rendimentos foram com 32,58 e 35,8% provenientes dos experimentos 8 e 12, respectivamente.

Tabela 15. Percentual de rendimento do processo de microencapsulação da peptidase produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em fermentação em estado sólido.

Experimento	Níveis fatoriais codificados			Níveis fatoriais não codificados			Valor (%)
	T (°C)	*VA (mL/min)	**EB/Ad	T (°C)	*VA (mL/min)	**EB/Ad	
1	-1	-1	0	50	3	1	43,75
2	+1	-1	0	100	3	1	63,12
3	-1	+1	0	50	9	1	66,12
4	+1	+1	0	100	9	1	61,00
5	0	0	0	75	6	1	52,87
6	0	0	0	75	6	1	54,44
7	0	0	0	75	6	1	55,94
8	-1	0	-1	50	6	0,5	32,58
9	+1	0	-1	100	6	0,5	59,87
10	0	-1	-1	75	3	0,5	45,00
11	0	+1	-1	75	9	0,5	42,71
12	-1	0	+1	50	6	1,5	35,80
13	+1	0	+1	100	6	1,5	57,03
14	0	-1	+1	75	3	1,5	52,46
15	0	+1	+1	75	9	1,5	49,00

* Vazão de alimentação ** Proporção extrato bruto/ adjuvante

No pré-estudo foi selecionado como adjuvante a maltodextrina, devido ao maior percentual de rendimento no processo.

A análise estatística indicou que a temperatura e a proporção EB/Ad foram significantes para o rendimento. O rendimento foi maior com o aumento da temperatura e com quantidades iguais de extrato bruto (EB) e adjuvante (Ad) (figura 23), entretanto, a vazão de alimentação (VA), não teve efeito significativo.

Figura 23. Superfície de resposta do rendimento do processo de microencapsulação da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, em função da temperatura e proporção EB/Ad.

Na figura 24, a atividade enzimática é mostrada em porcentagem de atividade preservada depois do processo, comparando com EB antes do processo. A vazão de alimentação não teve efeito na atividade enzimática, entretanto, temperaturas e EB/Ad médios demonstraram menor perda de atividade do EB microencapsulado.

Figura 24. Superfície de resposta da atividade enzimática, da enzima produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, após do processo de microencapsulação em função da temperatura e proporção EB/Ad.

Baixas concentrações de adjuvantes não foram suficientes para proteger a enzima de um possível dano resultado do processo de secagem. A perda de atividade quando adicionado altas concentrações de adjuvante pode estar relacionada com resultados do estudo de DePaz et al. (2002), no qual altas concentrações de alguns adjuvantes podem afetar a estrutura secundária das enzimas por impedimento estérico do sítio catalítico, durante a secagem. Outra possibilidade, segundo Tzannis et al. (1999) é que altas concentrações de carboidratos, formam preferencialmente interações açúcar-açúcar, conseqüentemente, a proteína não poderia estar efetivamente protegida durante a secagem.

4.7.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a determinação da forma e tamanho das micropartículas, foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micropartículas utilizadas foram as dos estudos 2, 3 e 4, os quais obtiveram maior rendimento. As micropartículas apresentaram tamanhos uniformes e forma esféricas e ovóides, com superfície lisa apresentando pouca rugosidade, figura 25.

Figura 25. Aspecto das micropartículas, obtidas através do processo de *Spray Drying*, observadas através de microscopia eletrônica de varredura.

4.7.2. Estabilidade das micropartículas

A estabilidade das micropartículas foi avaliada em função da atividade específica das micropartículas nos tempos, 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias, após o processo de microencapsulação.

A atividade específica é a razão entre a atividade proteolítica e a quantidade de proteínas totais. Para facilitar a visualização dos resultados, os gráficos foram plotados em atividade relativa em relação ao tempo zero, ou seja, atividade específica logo após o processo de microencapsulação de cada experimento.

A figura 26 apresenta a atividade relativa das micropartículas e do extrato bruto da fermentação sólida. O controle é o extrato bruto sem microencapsulação. O material foi estocado durante 180 dias a 25 °C.

Conforme podemos observar, atividade do controle manteve-se em queda gradativa com o passar dos dias de armazenamento, sendo que, após 180 dias de armazenamento, o controle manteve-se com apenas 25% de sua atividade proteolítica, já os experimentos 2, 9, 10, 11 e 13 mantiveram mais de 80% da atividade proteolítica da peptidase, os experimentos em sua maioria, os quais obtiveram esses resultados, foram realizados em temperaturas de 75 °C e 100 °C e com a proporção 0,5 de EB/Ad. Já os experimentos 12 e 15, os quais utilizaram uma menor proporção de adjuvante em relação ao extrato enzimático bruto, mantiveram cerca de 35% e 36%, da atividade proteolítica da peptidase, respectivamente.

Com esses resultados podemos inferir que, a quantidade de adjuvante no processo de microencapsulação é importante na manutenção da atividade proteolítica das enzimas microencapsuladas quando armazenadas a 25 °C.

Figura 26. Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, microencapsuladas, pelo do processo de *Spray Drying* com diferentes temperaturas, proporção EB/Ad e VA. O armazenamento foi realizados durante os períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias a 25 °C.

Na figura 27, apresentamos os resultados da estabilidade das micropartículas quando armazenadas em temperatura de 4 °C. Analisando os dados, foi possível observar a importância da temperatura de estocagem dessas micropartículas e do extrato bruto na manutenção da atividade proteolítica.

O extrato bruto manteve cerca de 90% de sua atividade proteolítica, após 180 dias de armazenamento, já as micropartículas, em geral, mantiveram mais de 90% da atividade proteolítica, mostrando assim, que o processo de microencapsulação da enzima, produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, não influencia diretamente na estabilidade e atividade quando armazenada a 4 °C. Não podemos afirmar que a enzima contida no extrato continuaria com atividade acima de 180 dias, mas o perfil de atividade indica que a enzima deve manter sua atividade quando exposta acima de 180 dias e armazenada a 4 °C.

A importância da microencapsulação não está relacionada apenas com a manutenção da atividade proteolítica, este processo também facilita a armazenagem, o transporte e a manipulação das peptidases.

Figura 27. Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Eupenicillium javanicum*, microencapsuladas, pelo do processo de *Spray Drying* com diferentes temperaturas, proporção EB/Ad e VA. O armazenamento foi realizados durante os períodos de 0, 15, 30, 60, 90 e 180 dias a 4 °C.

5. CONCLUSÕES

O fungo *Eupenicillium javanicum* mostrou potencial na produção de peptidases em bioprocesso submerso e sólido, entretanto com maior produção quando submetido ao bioprocesso sólido. No bioprocesso submerso o pico de produção foi após 144 horas a 30°C com meio suplementado com 0,25% de caseína, o que tornou quase inviável a produção por esse bioprocessos, assim optamos pela produção pelo bioprocessos sólido, visto que a produção foi mais rápida e superior, em cerca duas vezes em relação ao submerso. As melhores condições de produção de peptidase em meio sólido, foi utilizando 10% de albumina em relação ao resíduo agroindustrial farelo de trigo, o pico foi obtido após 72 horas a 30 °C.

Na caracterização bioquímica foi possível inferir que as enzimas produzidas em ambos bioprocessos podem ser semelhantes, pois as peptidases apresentaram maior atividade nos mesmos valores de pH e temperatura, além disso, foram inibidas pelo EDTA, podendo ser classificadas dentro do grupo das metalopeptidases. As enzimas produzidas mostraram uma boa estabilidade em diferentes valores de pH e temperatura, dessa maneira podendo ser aplicadas em diferentes áreas industriais.

O processo de purificação da peptidase do bioprocessos sólido mostrou-se viável, reprodutível, com recuperação de 5,6% e taxa de purificação de 10,8 vezes.

Na caracterização bioquímica da enzima, pura produzida em meio sólido, foi observado algumas diferenças quando comparada com a caracterização da enzima não pura, mostrando assim, a importância do processo de purificação da enzima para a determinação dessas características.

Analisando os parâmetros cinéticos concluímos que o lado “linha” da peptidase é o que mais influencia na eficiência catalítica da enzima, sendo que o subsítio S_1 é o que exerce maior influencia na catálise promovida pela peptidase em questão.

O processo de microencapsulação por *Spray Drying* mostrou-se viável e com a produção de peptidases estáveis, mantendo mais de 90% de sua atividade após 180 dias do processo, as micropartículas que foram armazenadas a 4 °C mantiveram mais atividade do que aquelas armazenadas a 25 °C. Todos os experimentos mantidos a 4 °C mantiveram mais de 80% da atividade e alguns experimentos armazenados a 25 °C mantiveram apenas 35% da atividade.

A peptidase produzida apresentou importantes características às quais a torna um potencial na aplicação em inúmeros e diferentes processos industriais.

6. REFERÊNCIAS

- ABIDI, F.; LIMAN, F. and NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biode detergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202-1208, 2008.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. Under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. **Process Biochemistry** v. 39 p. 977-981, 2004.
- ALLOUE, W. A.; DESTAIN, J.; AMIGHI, K.; THONARTI, P. Storage of *Yarrowia lipolytica* lipase after spray-drying in the presence of additives. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1357-1361, 2007.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; OKADA, K.; PESSOA, I. H. F. ; MILANEZ, A. I. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22 p. 114-117, 2005.
- AMERI, A.; MAA, Y. F. Spray Drying of Biopharmaceuticals: Stability and Process Considerations. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 763 – 768, 2006.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p.175-183, 1997.
- BELGHITH, H.; CHAABOUNI, S. E.; GARGOURI, A. Stabilization of *Penicillium occitanis* cellulases by spray drying in presence of Maltodextrin. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.253–258, 2001.
- BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrate for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 419-425, 1991.

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; JODHA, D.; SINGH, J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: an overview. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 22, p. 96-101, 2011.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012-1018, 2008.

DEPAZ, R. A. ; DALE, D. A. ; BARNETT, C.C. ; CARPENTER, J. F. ; GAERTNER A. L. ; RANDOLPH, T. W. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31 p.765-774, 2002.

DUCROS, E.; FERRARI, M.; PELLEGRINO, M.; RASPANTI, C.; BOGNI, C. Effect of aeration and agitation on the peptidase production by *Staphylococcus aureus* mutant RC128 in a stirred tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32 p. 143-148, 2009.

DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. Great Britain: IRL Press, p. 57-81, 1989.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 234-237, 2006.

GRAHN, S.; KURTH, T.; ULLMANN, D.; JAKUBKE, H. S' subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1431, p. 329-337, 1999.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

HAJJI, M.; REBAI, A.; GHARSALLAH, M.; NASRI, M. Optimization of alkaline protease production by *Aspergillus clavatus* ES1 in *Mirabilis jalapa* tuber powder using statistical experimental design. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79 p. 915-923, 2008.

HAQ, I. U.; MUKHTAR, H.; UMBER, H. Production of protease by *Penicillium chrysogenum* through optimization of environmental conditions. **Journal of Agriculture & Social Sciences**, v. 2, p. 23-25, 2006.

HATANAKA, T.; UESUGI, A. Y.; IWABUCHI. Purification, characterization cloning, and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 434, p. 289-298, 2005.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkaliphilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimisation and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40 p.1263–1270, 2005.

KLEMENCIC, I.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KRIZAJ, I.; TURK, V.; TURK, B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, 5404–5412, 2000.

KONDO, M. Y. Caracterização do mecanismo catalítico da SGP, enzima protótipo das glutâmico peptidases. 2012. 122p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

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

KUMAR, S.; SHARME, N. S.; SAHARAN, M. R.; SINGH, R. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MADRUGA, S.; CAMARA, S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. **Food Biochemistry**, v. 68 p. 41-44, 2000.

MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**. v. 104 p. 127-131, 2007.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, C.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLI, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. (2009) Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57 n. 19 p. 9210 – 9217.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 137-148, 2011.

NAKADATE, S.; NOZAWA, K.; HORIE, H.; FUJII, Y.; NAGAI, M.; HOSOE, T.; KAWAI, K.; YAGUCHI, T.; FUKUSHIMA, K. Eujavanicols A-C, decalin derivatives from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1510-1512.

NAKADATE, S.; NOZAWA, K.; SATO, H.; HORIE, H.; FUJII, Y.; NAGAI, M.; HOSOE, T.; KAWAI, K.; YAKAGUSHI, T. Antifungal Cyclic Depsipeptide, Eujavanicin A, Isolated from *Eupenicillium javanicum*. **Journal of Natural Products**, v. 71 p. 1640-1642, 2008.

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and Products. **Process Biochemistry**, v.35 p.1153-1169, 2000.

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMANATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences** 5, v. 3, p. 308-312, 2009.

RADHA, S.; NITHYA, V.J.; BABU, R. H.; SRIDEVI, A.; PRASAD, N.; NARASIMHA, G. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged fermentation. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 2, p. 155-163, 2011.

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

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V., Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **American Society for Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 597 – 635, 1998.

RAO, S. C.; SATHISH, T.; RAVICHANDRA, P.; PRAKASHAM, R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 262-268, 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. Asparagine peptide lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286 p. 38321-38328, 2011.

ROSA, E. D; TSUKADA, M.; FREITAS, L.A.P. **Secagem por atomização na indústria alimentícia: fundamentos e aplicações**. Ribeirão Preto, 2006. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/Exclusivo/Inserir/Anexos/LinkAnexos/secagem%20de%20materiais.pdf>>. Acesso em 20/06/2012.

SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical, and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 224-230, 2011. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55 n. 1 p. 13-18, 2011.

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

SANTOS, J. A. N. Inibição e especificidade da Lbpro do vírus da febre aftosa. 2009. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

SARATH G., DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R.J.; BOND J. S. **Proteolytic enzymes: a practical approach**. New York: Oxford University, 1996.

SAVITHA, S.; SADHASIVAN, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SAXENA, R.; SINGH, R. Characterization of a metallo-protease produced in solid state fermentation by a newly isolated *Bacillus* strain. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 55, p. 13-18, 2011.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. **Protein structure a pratical approach**. New York: Oxford University, p. 1-19, 1989.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275-2279, 2002.

SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **Biochemical Journal**, v. 383, p. 311-318, 2004.

SIALA, R.; SELLAMI-KAMOUN, A.; HAJJI, M.; ABID, I.; GUARSALLAH, N.; NASRI, M. Extracellular acid protease from *Aspergillus niger* I1: purification and characterization. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 18, p. 4582-4589, 2009.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13-18, 2009.

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

SUKHOSYROVA, E. A.; NIKITINA, Z. K.; YAKOVLEVA, M. B.; VESHCHIKOVA, E. V.; BYKOV, V. A. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447-451, 2003.

TANAKA, M. ; SUMIDA, T. ; MITSUI, R. Effect of culture conditions on production of cellulases and xylanases by *Eupenicillium javanicum*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89 p. 215, 2000.

TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of Food Science**, v. 67 n. 3, p. 1184-1187, 2002.

TSURUOKA, N.; NAKAYAMA, T.; ASHIDA, M.; HEMMI, H.; NAKAO, M.; MINAKATA, H.; OYAMA, H.; ODA, K.; NISHINO, T.; Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning and heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 162-169, 2003

TZANNIS, S. T.; PRESTRESKY, S. J. Moisture effects on protein-exciipient interactions in Spray-Dried powders. Nature of destabilizing effects of sucrose. **Journal of Pharmaceutical science**, v. 88 n. 3 p. 361-370, 1999.

VERMA, A.; PAL, H. S.; SINGH, R.; AGARWAL, S. Potential of alkaline protease isolated from *thermoactinomyces* sp. RM4 as an alternative to conventional chemicals in leather industry dehairing process. **Int. Jr. of Agril., Env. And Biotech.**, v. 4, n. 2, p. 173-178, 2011.

VISHWANATHA, K. S.; APPU-RAO, A. G. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 127-138, 2010.

WU, J.; CHEN, X. Extracellular metalloproteases from bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, p. 253-262, 2011.

WU, T. Y.; MOHAMMAD, A. W.; JAHIN, Md.; ANUAR, N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39 p.1223–1229, 2006.

YEGIN, S.; FERNÁNDEZ-LAHORE, M.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y. Production of extracellular aspartic protease in submerged fermentation with *Mucor mucedo* DSM 809. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 6380-6386, 2010.