UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris*

Ana Claudia Rodrigues de Siqueira

**Ribeirão Preto
2017**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e
obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase
expressa em *Pichia pastoris***

Ana Claudia Rodrigues de Siqueira

Ribeirão Preto
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e
obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase
expressa em *Pichia pastoris***

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Ana Claudia Rodrigues de
Siqueira

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 05/06/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

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

SIQUEIRA, A. C. R. Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris*. 2017. 116f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos naturais e sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Produção selvagem 2. Expressão heteróloga. 3. Enzima bifuncional. 4. Protease. 5. Fungo filamentosos.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Claudia Rodrigues de Siqueira

Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris*

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor 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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

"Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes".

(Martin Luther King)

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais, irmã, parentes e amigos que foram testemunhas e apoiaram esta jornada pessoal, rica em conhecimento e crescimento científico.

Obrigada a todos!

Agradecimento

A Deus por me proporcionar vida e possibilidade para que eu pudesse aprender, ensinar e crescer como pessoa e cientista.

Aos meus pais, Maria Madalena e Vilmar, e a minha irmã Isabel pelo amor, apoio e companheirismo.

A minha família e amigos em Goiânia pelo incentivo, que mesmo longe estiveram comigo de alguma forma.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral pela oportunidade, orientação, estrutura e liberdade para que eu pudesse desenvolver todos os trabalhos propostos.

À Nathalia G. Rosa e Luciana Coitinho pela disponibilidade, ajuda e amizade.

Aos amigos de laboratório, Youssef, Ronivaldo, Rafael, Juliana, Sandra e aqueles que já passaram, mas que fazem parte da minha história. Este grupo me proporcionou conhecer o significado real de amizade, onde apesar das diferenças sempre houve respeito. Foram anos de muita risada e acima de tudo muito trabalho no laboratório de Tecnologia Enzimática.

Aos amigos do grupo de oração Filhos da Luz, onde sempre encontrei um apoio e amor incondicional. Meu caminho em Ribeirão Preto tornou-se mais florido e feliz pela presença de vocês em minha vida.

Aos laboratórios colaboradores da Profa. Dra. Andreia Machado Leopoldino e Prof. Dr. Sérgio Akira, que disponibilizaram sua estrutura para que pudesse realizar este trabalho.

Aos amigos, Fernando, Shaiani, Estela, Gabriela, Paulina, Simon, Laís, Ana Carolina e Lívia pelas palavras de conforto e convivência rica.

Aos professores e pesquisadores que fizeram parte desta jornada de alguma forma, Dr. Benevides Costa Pessela, Dr. Flávio Emeri, Dra. Rita de Cássia Bianchi e Dra. Telma Alves Garcia.

E a todos aqueles que não foi possível nomear, mas que fizeram parte deste trabalho de alguma forma.

Aos funcionários na FCFRP que diariamente possibilitam a realização dos nossos trabalhos. Ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto pela possibilidade de execução deste trabalho.

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

Epígrafe

“Qualquer um que tenha sido seriamente engajado no trabalho científico de qualquer tipo percebe que nos portões de entrada do templo da ciência estão escritas as palavras:

‘Você deve ter fé!’ . ”

Max Planck

RESUMO

SIQUEIRA, A. C. R. **Produção de peptidase e lipase nativas por *Fusarium oxysporum* e obtenção de uma quimera recombinante de peptidase e lipase expressa em *Pichia pastoris*.** 2017. 116f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

As hidrolases, principalmente as peptidases e lipases, são responsáveis pelo alto faturamento no mercado mundial e pelos diversos empregos industriais e biotecnológicos. A obtenção destas proteínas ocorre pela aplicação dos microrganismos a bioprocessos, tanto de forma selvagem quanto por expressão heteróloga. Neste contexto, existe uma busca incessante por enzimas mais estáveis e com maior atividade catalítica, e algumas técnicas têm sido utilizadas para o melhoramento destes parâmetros. A obtenção da peptidase e lipase pelo fungo *Fusarium oxysporum* foi realizada por bioprocessos submersos, gerando picos de 165 U/mL em 72 horas e 633 U/mL em 48 horas, respectivamente. A peptidase foi purificada utilizando a resina Sephadex G-50 de exclusão de massa e caracterizada utilizando um substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência. A classe da proteína foi determinada como serino peptidase e demonstrou características neutra e estável quanto ao pH em uma faixa ampla. A temperatura ótima foi de 50 °C e a partir dos ensaios de estabilidade térmica foi evidenciado a manutenção da atividade proteolítica de 60-90% até 60 °C no período de uma hora. Quanto à eficiência catalítica, os subsítios S₁, S₂ e S'₁ tem certa especificidade, pois não demonstram eficiência catalítica quando há a presença dos seguintes aminoácidos nas respectivas posições dos substratos P₁ (ácido aspártico, prolina e isoleucina), P₂ (ácido aspártico, histidina, lisina, asparagina e triptofano) e P'₁ (ácido aspártico, ácido glutâmico e prolina), ao contrário dos subsítios S₃, S'₂ e S'₃, onde todos aminoácidos apresentaram eficiência catalítica. A lipase foi purificada utilizando resina iônica e apresentou características básica e estabilidade em pH neutro, sua temperatura ótima foi de 35 °C e manutenção da atividade catalítica em pelo menos 50% após 1 hora de exposição a 25 a 40 °C. A produção da quimera deu-se pela busca de uma peptidase e uma lipase provenientes do fungo *F. oxysporum* no banco de dados, elas foram então fusionadas utilizando um *linker* composto por cinco aminoácidos (GGAGG) nas regiões C-terminal da peptidase e N-terminal da lipase. Ambas atividades foram detectadas na quimera, tornando-a funcional. A aplicação biotecnológica de ambas enzimas selvagens e recombinante é um passo importante para inovação, e de acordo com as características apresentadas cada enzima pode ser aplicada a diversos processos industriais, desde detergentes a biorremediação.

Palavras-chave: Protease, fungo filamentoso, enzima bifuncional, produção selvagem, expressão heteróloga.

ABSTRACT

SIQUEIRA, A. C. R. **Production of native peptidase and lipase from *Fusarium oxysporum* and obtainment of a recombinant chimera formed by peptidase and lipase expressed in *Pichia pastoris***. 2017. 116f. Doctoral Thesis. School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Hydrolases, especially peptidases and lipases, are responsible for several industrial and biotechnological applications therefore high income in the world market. The main source of these proteins is wild-type microorganisms by bioprocesses or by heterologous expression. In this context, there is an incessant search for more stable enzymes with higher catalytic activity, and some techniques have been used to improve these parameters. Obtainment of peptidase and lipase by the fungus *Fusarium oxysporum* was performed by submerged bioprocess, generating peaks of 165 U / mL in 72 hours and 633 U / mL in 48 hours, respectively. Peptidase was purified using the Sephadex G-50 size exclusion resin and characterized using a peptide substrate with intramolecular fluorescence suppression. The enzyme class was determined as serine peptidase and demonstrated neutral and stable characteristics in a wide range of pH. The optimum temperature was 50 ° C and the thermal stability assays showed the maintenance of the proteolytic activity from 60 to 90% up to 60 ° C within one hour of exposure. As for catalytic efficiency, the S1, S2 and S'1 subsites have a certain specificity, since they do not demonstrate catalytic efficiency when the following amino acids are present in the respective positions of the substrates P1 (aspartic acid, proline and isoleucine), P2 (aspartic acid, Histidine, lysine, asparagine and tryptophan) and P'1 (aspartic acid, glutamic acid and proline), unlike subsites S3, S'2 and S'3, where all amino acids showed catalytic efficiency. The lipase was purified using ionic resin and presented basic characteristics and stability at neutral pH, its optimum temperature was 35 ° C and maintenance of the catalytic activity by 50% after 1 hour of exposure at 25 to 40 ° C. Production of the chimera was done by the search of a peptidase and a lipase from the fungus *F. oxysporum* in the database, they were then fused using a linker composed of five amino acids (GGAGG) in the C-terminal regions of the peptidase and N- Terminal portion of the lipase. Both activities were detected in the chimera, making it functional. The biotechnological application of both wild and recombinant enzymes is an important step for innovation, and according to the characteristics presented each enzyme can be applied to several industrial processes.

Keywords: Protease, filamentous fungus, bifunctional enzyme, wild production, heterologous expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do mecanismo catalítico de lipases.	04
Figura 2. Representação da hidrólise de substratos para ação de lipases.	05
Figura 3. Representação de diferentes sínteses mediadas por lipases.	05
Figura 4. Representação de diferentes sínteses a partir de transesterificação mediadas por lipases.	06
Figura 5. Representação do mecanismo catalítico de serino peptidases.	09
Figura 6. Representação do sítio catalítico das peptidases, baseado no modelo de Schechter e Berger.	10
Figura 7. Fotografia de <i>Fusarium oxysporum</i> após 72 h em PDA.	17
Figura 8: Esquema ilustrativo - processo de purificação da lipase.	26
Figura 9: Esquema ilustrativo - processo de purificação da peptidase.	27
Figura 10. Mecanismo de ação da lipase na hidrólise do substrato <i>p</i> -nitrofenil palmitato.	27
Figura 11. Mecanismo de ação da lipase na hidrólise do substrato 4-Metilumbeliferil-butirato.	29
Figura 12. Esquema do mecanismo de hidrólise e princípio do funcionamento dos substratos peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência (FRET).	30
Figura 13. Perfil de produção de lipase em bioprocesso submerso por <i>F. oxysporum</i> cultivado em meio padrão ou em meio suplementado.	34
Figura 14. Perfil cromatográfico e atividade enzimática das frações obtidas do processo de purificação da lipase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	34
Figura 15. Atividade lipolítica <i>in situ</i> e perfil de proteínas de amostras envolvidas nas etapas de purificação de lipase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	34

Figura 16. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática da lipase pura produzida pelo fungo <i>F. oxysporum</i> .	36
Figura 17. Efeito de pH e temperatura na estabilidade da lipase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	36
Figura 18. Efeito de surfactantes na atividade enzimática da lipase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	38
Figura 19. Efeito de agentes caotrópicos e agente redutor na atividade enzimática da lipase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	39
Figura 20. Perfil de produção de peptidase em bioprocessamento submerso por <i>F. oxysporum</i> em meio padrão e suplementado.	39
Figura 21. Perfil cromatográfico e atividade enzimática das frações obtidas do processo de purificação da peptidase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	40
Figura 22. Perfil de proteínas em gel SDS-PAGE 12% em coloração com nitrato de prata das etapas de purificação da peptidase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	41
Figura 23. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática da peptidase pura produzida pelo fungo <i>F. oxysporum</i> .	41
Figura 24. Efeito de pH e temperatura na estabilidade da peptidase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	42
Figura 25. Efeito de surfactantes na atividade enzimática da peptidase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	44
Figura 26. Efeito de agentes caotrópicos e agente redutor na atividade enzimática da peptidase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	45
Figura 27. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P ₁ .	46
Figura 28. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P ₂ .	47

Figura 29. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P ₃ .	48
Figura 30. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P' ₁ .	49
Figura 31. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P' ₂ .	50
Figura 32. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos com substituições na posição P' ₃ .	51
Figura 33. Mapa do vetor de expressão pPICZα A.	66
Figura 34. Sequência do vetor de expressão pPICZα A.	67
Figura 35. Mapa do vetor de expressão pJET1.2.	72
Figura 36. (A) Sequência de aminoácidos da peptidase proveniente de <i>F. oxysporum</i> , subilisina-like; (B) Análise de domínios a partir do software online Interpro scan.	76
Figura 37. (A) Sequência de aminoácidos da lipase proveniente de <i>F. oxysporum</i> ; (B) Análise de domínios a partir do software online Interpro scan.	77
Figura 38. Estruturas modelos para determinação da ordem da enzima bifuncional: (A) modelo obtido pelo software online PSI; (B) modelo de lipase de <i>Thermomyces lanuginosa</i> .	78
Figura 39. (A) Sequência de aminoácidos da enzima bifuncional (quimera) proveniente de sequências de <i>F. oxysporum</i> ; (B) Análise de domínios a partir do software online Interpro scan.	79
Figura 40. Perfil proteico e de atividade <i>in situ</i> de duas cepas diferentes de <i>Pichia pastoris</i> transformadas com inserto pPICZαA-Quimera.	80
Figura 41. Perfil proteico do extrato bruto da indução da enzima bifuncional produzida por <i>P. pastoris</i> durante 144 horas.	81
Figura 42. Cromatograma da purificação da enzima bifuncional produzida por <i>P. pastoris</i> .	81
Figura 43. Perfil proteico e de atividade <i>in situ</i> da fração purificada	82

contendo a enzima bifuncional recombinante produzida por *P. pastoris*.

Figura 44. Efeito de pH e temperatura na atividade proteolítica da enzima bifuncional pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	82
Figura 45. Avaliação da estabilidade em pH e temperatura na atividade proteolítica da enzima bifuncional pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	83
Figura 46. Avaliação do efeito de surfactantes sobre a atividade proteolítica da quimera pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	84
Figura 47. Efeito de agentes caotrópicos e DTT na atividade proteolítica da quimera pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	85
Figura 48 Material amplificado referente a peptidase e lipase após o PCR de colônia realizado para os insertos de modo separado.	86
Figura 49. Reação de restrição lipase; peptidase; pPiczaA.	86
Figura 50. Sequenciamento para comprovação da presença do material genético amplificado (Peptidase), sem a presença da lipase.	87
Figura 51. Sequenciamento para comprovação da presença do material genético amplificado (Lipase), sem a presença da lipase.	88
Figura 52. Perfil de auto-hidrólise da quimera pela peptidase em sua estrutura.	89
Figura 53. Efeito do pH na atividade enzimática da lipase pertencente à enzima bifuncional Quim_LP.	116
Figura 54. Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase pertencente à enzima bifuncional Quim_LP.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Definição e classificação de peptidases.	08
Tabela 2. Levantamento de enzimas bifuncionais originárias de microrganismos e suas potenciais aplicações	20
Tabela 3. Parâmetros obtidos durante as etapas de purificação da lipase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	35
Tabela 4. Efeito de íons na atividade enzimática da lipase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	36
Tabela 5. Parâmetros obtidos durante as etapas de purificação da peptidase produzida por <i>F. oxysporum</i> .	40
Tabela 6. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da peptidase pura produzida por <i>F. oxysporum</i> .	43
Tabela 7. Efeito de íons sobre a atividade enzimática da peptidase pura produzida pelo fungo <i>F. oxysporum</i> .	43
Tabela 8. Comparação de características bioquímicas de diferentes lipases e peptidases purificadas em diversos estudos.	55
Tabela 9. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima bifuncional pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	83
Tabela 10. Efeito de íons na atividade proteolítica da quimera pura produzida por <i>P. pastoris</i> .	84
Tabela 11. Comparação de características bioquímicas de diferentes subtilisinas.	92
Tabela 12. Sumário das características das enzimas purificadas no trabalho.	113
Tabela 13. Valores numéricos dos parâmetros cinéticos dos subsítios S ₁ , S ₂ e S ₃ .	114
Tabela 14. Valores numéricos dos parâmetros cinéticos dos subsítios S' ₁ , S' ₂ e S' ₃ .	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURA DE AMINOÁCIDOS

Aminoácido	Abreviatura – Três letras	Abreviatura – Uma letra
ALANINA	Ala	A
ASPARAGINA	Asn	N
ÁCIDO ASPÁRTICO	Asp	D
ARGININA	Arg	R
CISTEÍNA	Cys	C
FENILALANINA	Phe	F
GLICINA	Gly	G
GLUTAMINA	Gln	Q
ÁCIDO GLUTÂMICO	Glu	E
HISTIDINA	His	H
ISOLEUCINA	Ile	I
LEUCINA	Leu	L
LISINA	Lys	K
METIONINA	Met	M
PROLINA	Pro	P
SERINA	Ser	S
TIROSINA	Tyr	Y
TREONINA	Thr	T
TRIPTOFANO	Trp	W
VALINA	Val	V

Abz	Ácido orto-aminobenzóico
AE	Atividade específica
AIA	Ácido iodoacético
AOX1	Gene aldeído oxidase 1
AOX2	Gene aldeído oxidase 2
BLAST	Ferramenta básica de alinhamento local e busca
BMGY	Meio glicerol complexo tamponado (<i>Buffered glycerol complex medium</i>)
BMMY	Meio metanol complexo tamponado (<i>Buffered methanol complex medium</i>)
CAPS	Ácido 3-(cicloexilamino)-1-propanosulfônico
CMC	Concentração crítica micelar
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamonio
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O. _{600nm}	Densidade óptica em 600nm
DTT	Ditiotreitol
EC	<i>Enzyme comission number</i>
EDDnp	Grupo etilenodiamo-dinitro-fenil
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid

est	Estabilidade
FRET	substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência
Gn	Cloridrato/Sulfato de guanidina
GRAS	<i>Geralmente reconhecido como segura</i>
HEPES	Ácido (4-(2-hifroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
Kex2	Kexina 2
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LED	<i>Lipase Engineering Database</i>
LMW	<i>Low molecular weight</i> – baixo peso molecular
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanosulfônico
MU	4-metilumbeliferone
MU-Bu	4-Metilumbeliferil-butirato
Mut ^s	Methanol utilization slow
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
otm	Ótimo
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDA	Ágar batata dextrose
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Phenylmethysulphonyl fluoride
p-NPP	p-nitrofenil palmitato
PSI-KB	Protein Structure Initiative Knowledgebase
SDS	Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Triton X-100	4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol (4-(1,1,3,3 – Tetrametil-butil) fenil-polietileno glicol)
Tx	Triton X-100
Tw	Tween 80
Tween 80	Polysorbato 80
Tween20	Polysorbato 20
UniProt	Universal Protein Resource
Ur	Ureia
YEPD	Meio de cultura contendo extrato de levedura (<i>Yeast extract</i>), peptona (<i>Peptone</i>) e dextrose (<i>Dextrose</i>)
YNB	Base nitrogenada de levedura (<i>Teast Nitrogen Base</i>)
YPDS	Meio de cultura contendo extrato de levedura (<i>Yeast extract</i>), peptona (<i>Peptone</i>), Dextrose e Sorbitol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
U\$	Dólar
α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
mm	Milímetro
cm	Centímetro
rpm	Rotações por minuto
mM	Mili molar
mL	Mililitro
ρ	Para
Da	Dalton
min	Minutos
mg	Miligrama
nm	Nanometro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
λ_{ex}	Comprimento de onda de excitação
λ_{em}	Comprimento de onda de emissão
K_M	Constante de Michaelis-Menten
k_{cat}	Constante catalítica

k_{cat}/K_M	Constante específica/Eficiência catalítica
UAF	Unidade arbitrária de fluorescência
U	Unidade enzimática
kDa	kilo Dalton
s	Segundos
$S_{(1-3)}$	Subsítio da região N-terminal
$S'_{(1-3)}$	Subsítio da região C-terminal
$P_{(1-3)}$	Posição no substrato da região N-terminal
$P'_{(1-3)}$	Posição no substrato da região C-terminal
®	Registrado
™	<i>Trade mark</i> – marca comercial
Å	Ângstrom
M	Molar
kV	kilo Voltz
µF	Micro Farad
Ω	Ohm
L	Litro
<i>g</i>	Força centrífuga

Sumário

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xii
APRESENTAÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	22
Capítulo 1.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2.1. Identificação e manutenção do microrganismo.....	24
2.2. Preparo do inóculo.....	24
2.3. Bioprocesso submerso.....	24
2.4. Processos de purificação.....	25
2.4.1. Lipase.....	25
2.4.2. Peptidase.....	26
2.5. Quantificação de proteína total.....	27
2.6. Avaliação da atividade lipolítica com substrato p-NPP.....	27
2.7. Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína.....	28
2.8. Caracterização bioquímica funcional.....	28
2.8.1. Substrato fluorescente 4-Metilumbeliferil-butirato – lipase.....	29
2.8.2. Substrato peptídico FRET – peptidase.....	29
2.8.3. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática.....	31
2.8.4. Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática.....	31
2.8.5. Efeito de inibidores na atividade proteolítica.....	31
2.8.6. Efeito de íons, surfactantes, agentes caotrópicos e DTT na atividade enzimática.....	32
2.9. Determinação da especificidade pela cinética enzimática – peptidase...32	
3. RESULTADOS.....	34
3.1. Lipase nativa.....	34
3.1.1. Produção via bioprocesso submerso e purificação.....	34
3.1.2. Caracterização bioquímica utilizando substrato fluorescente MU-Bu.....	36

3.2. Peptidase nativa.....	39
3.2.1. Produção via bioprocesso submerso e purificação.....	39
3.2.2. Caracterização bioquímica utilizando substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência.....	41
3.2.3. Determinação de especificidade da peptidase - Cinética enzimática.....	45
4. DISCUSSÃO.....	52
4.1. Bioprocessos.....	52
4.2. Purificação das hidrolases nativas.....	53
4.3. Caracterização bioquímica das hidrolases nativas.....	54
4.3.1. Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	54
4.3.2. Efeito de inibidores na atividade proteolítica.....	55
4.3.3. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática.....	56
4.3.4. Efeito de surfactantes na atividade enzimática.....	58
4.3.5. Efeito de agentes caotrópicos e DTT na atividade enzimática.....	60
4.3.6. Estudo de especificidade e sequenciamento– peptidase.....	61
5. CONCLUSÃO.....	63
Capítulo 2.....	64
1. INTRODUÇÃO.....	64
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1. Determinação da composição da enzima bifuncional – peptidase e lipase.....	65
2.2. Expressão heteróloga – pPICZ α A e <i>Pichia pastoris</i>	66
2.2.1. Linearização – pPICZ α A-Quimera.....	67
2.2.2. Transformação em <i>Pichia pastoris</i>	68
2.2.3. Screening da expressão.....	68
2.2.4. Expressão em larga escala e purificação da Quimera (QuimLP)	69
2.2.4.1. Zimograma – Lipase.....	70
2.2.4.2. Zimograma – Peptidase.....	70
2.2.5. Clonagem das enzimas lipase e peptidase heterólogas separadas.....	71
2.2.5.1. Subclonagem e transformação em <i>Escherichia coli</i> DH10 β	71
2.2.5.2. Restrição e expressão em <i>P. pastoris</i>	73
2.3. Caracterização bioquímica funcional QuimLP – peptidase.....	74
3. RESULTADOS.....	76
3.1. Obtenção de enzima bifuncional composta por peptidase e lipase.....	76

3.2.	Caracterização bioquímica funcional Quimera – peptidase.....	82
3.3.	Clonagem das enzimas peptidase e lipase heterólogas separadas.....	85
3.4.	Desafios.....	89
4.	DISCUSSÃO.....	91
5.	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICES.....	113

APRESENTAÇÃO

A biotecnologia é um campo da ciência e tecnologia em ávido crescimento. Ela abrange diferentes e amplas áreas do conhecimento, tais como a bioquímica, genética, química, engenharia, microbiologia, física e outras áreas. Tem como uma de suas várias definições, a aplicação de processos moleculares e celulares para resolução de problemas, realização de pesquisas e criação de produtos e serviços. Ela inclui um conjunto diversificado de tecnologias que manipulam componentes celulares, sub-celulares ou moleculares nos seres vivos para fabricar produtos ou promover novos descobrimentos sobre a base molecular e genética da vida, ou ainda modificar características específicas de plantas, animais e microrganismos (PELE; CIMPEANU, 2012).

Devido a sua abrangência, a biotecnologia foi dividida de acordo com suas aplicações em: biotecnologia vermelha (relacionada à saúde e processos médicos), branca (relacionada a processos industriais em geral, pelo uso de enzimas e organismos para o processamento e produção de produtos químicos, materiais, biocombustíveis, alimentos, entre outros), verde (uso de soluções *eco-friendly* como uma alternativa à agricultura, horticultura e pecuária tradicional), azul (relacionada a processos marinhos e aquáticos), preta (relacionada a bioterrorismo) e cinza (relacionada ao meio-ambiente na manutenção da biodiversidade e remoção de contaminantes) (ELSEVIER, 2016). Dentro desta grande área, este trabalho pode ser incluído tanto na biotecnologia branca quanto na biotecnologia cinza com inúmeras aplicações.

A biocatálise tem se tornado um dos maiores campos da biotecnologia, onde as células vivas ou suas enzimas são capazes de catalisar reações químicas, consequentemente desenvolvendo processos *eco-friendly* e criando uma indústria sustentável (VERMELHO et al., 2013). Para tanto, a tecnologia enzimática surge para desenvolver novos e melhores produtos, processos e serviços para atender às necessidades industriais, comerciais, domésticas ou individuais, além de gerar conhecimento acerca das enzimas, e sua participação nos processos fisiológicos e patológicos.

Enzimas – Hidrolases

As enzimas são macromoléculas biológicas, cuja função de acelerar reações bioquímicas data de anos antes de Cristo. Entretanto, somente no século XVIII foi iniciado o processo de descobrimento das enzimas como responsáveis por diversas dessas reações. Durante o século XIX, cientistas demonstraram a presença de enzimas associadas às células vivas em diferentes processos. Em 1897, Büchner comprovou que havia função enzimática isolada de uma célula viva, quando demonstrou a conversão de glicose em etanol por um extrato bruto livre de levedura. A partir deste ponto, diversas descobertas foram feitas, e em 1960 a primeira enzima comercial – uma peptidase de *Bacillus amyloliquefaciens* – foi lançada pela empresa NOVO (DWEVEDI, 2016).

Devido às diversas descobertas de novas enzimas e a fim de propagar o conhecimento de forma concisa e unificada, a União Internacional de Bioquímica (atualmente, União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular) reuniu uma comissão para determinar uma terminologia padrão para enzimas. A classificação principal consiste nas classes: oxidoredutases (EC 1), transferases (EC 2), hidrolases (EC 3), liases (EC 4), isomerases (EC 5) e ligases (EC 6). Dentro de cada classe, são determinadas subclasses e sub-subclasses, a depender da especificidade da enzima.

Estas proteínas possuem infinitas funções fisiológicas e patológicas nos seres vivos. A partir do isolamento e caracterização das enzimas foi possível determinar e conhecer múltiplos mecanismos bioquímicos, que despertaram o interesse na utilização destes catalisadores eficientes e sustentáveis em inúmeros processos industriais. Atualmente, são conhecidas mais de 3000 diferentes enzimas, porém somente 150 a 170 possuem aplicações comerciais, e pelo menos 500 produtos são obtidos com o auxílio delas (BINOD et al., 2013; KUMAR; SINGH, 2013).

O mercado enzimático mundial está em crescimento numa taxa anual aproximada de 4,6%. Em 2014 este mercado foi avaliado em U\$ 4,2 bilhões e a perspectiva para 2020 é de U\$ 7,2 bilhões. A classe enzimática dominante do mercado são as hidrolases, cerca de 75%, liderando este ranking estão as carboidrases, seguidas das peptidases e lipases (“World Enzymes - Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders”, 2015).

As hidrolases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de um determinado substrato, são milhares de enzimas pertencentes a esta classe. Dentre elas, estão duas subclasses importantes e dominantes, as lipases e peptidases.

Lipases

As lipases são serino hidrolases definidas como triacilglicerol acilhidrolases (EC 3.1.1.3) e devem ser diferenciadas das esterases (EC 3.1.1.1). Atualmente existem diversas teorias para distinguir lipases de esterases: pela composição de aminoácidos e distribuição eletrostática, pela natureza de seus substratos, pela presença de uma interface na ativação enzimática, entre outras. Porém, cada uma destas hipóteses apresentou exceções, implicando na dificuldade e necessidade de mais estudos frente a esses dois tipos de hidrolases (CASAS-GODOY et al., 2012; FOJAN et al., 2000).

Estruturalmente, as lipases possuem quatro principais características. A primeira incide na sua conformação comum de α/β hidrolase, composta por uma folha β central, formada por oito cadeias β paralelas, com apenas a segunda cadeia antiparalela, onde β_3 a β_8 são ligadas através de α -hélices. Esta estrutura pode variar na quantidade de α -hélices, folhas β ou ainda arquitetura dos sítios de ligação (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998). A segunda é a presença de uma tríade catalítica conservada composta de um resíduo nucleofílico – serina –, um resíduo ácido – aspartato ou glutamato – e uma histidina (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A terceira constitui no “*oxianion hole*”, característica gerada pelo mecanismo catalítico das lipases (figura 1), cuja função é estabilizar as cargas negativas geradas pelos intermediários durante a hidrólise (CYCLER; SCHRAG, 1997). E finalmente, a quarta característica, a qual não é obrigatória a todas as lipases: a *lid* é uma estrutura móvel que cobre o sítio ativo a fim de impedir o acesso ao substrato a não ser que haja uma ativação interfacial, onde esta estrutura se abre e expõe o sítio ao substrato, ela é constituída por uma ou mais α -hélices ligadas à estrutura principal da enzima (HOU; SHIMADA, 2009; JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999).

Figura 1. Representação do mecanismo catalítico das lipases na hidrólise de ligações ester de tri-, di- e/ou monoacilgliceróis.

FONTE: Casas-Godoy et al., 2012. Figura adaptada.

A classificação das lipases ainda é um campo em desenvolvimento e é atualizado frequentemente. Além da classificação de acordo com a fonte (animal, vegetal ou microbiana) e pH de ação (ácida, neutra ou alcalina), existem outras abordagens. De acordo com Arpigny e Jaeger (1999) as lipases são classificadas em oito famílias, das quais seis são referentes a α/β hidrolases, no total são 15 famílias distintas em sequência e estrutura. Outra classificação reconhecida é a utilizada pelo banco de dados *"The Lipase Engineering Database - LED"*. Esta classificação é baseada na composição de aminoácidos do *"oxyanion hole"*, onde as lipases são subdivididas em três classes: GGGX (4 superfamílias de lipases e 2 de esterases), GX (10 superfamílias de lipases e 17 de lipase-like) e Y (1 superfamília de lipase) (GUPTA et al., 2015).

As lipases são catalisadores da hidrólise de tri-, di- e monoacilgliceróis insolúveis em ácidos graxos livres, monoacilglicerol, diacilglicerol e glicerol (figura 2) (JOSEPH; RAMTEKE; THOMAS, 2008). Além disso, são responsáveis pela catálise de reações de esterificação, interesterificação e transesterificação em meio não-aquoso (figura 3 e 4) (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SHARMA; CHISTI; CHAND, 2001).

Figura 2. Representação da hidrólise de substratos sujeitos à ação de lipases: **(a)** triacilglicerol em diacilglicerol e ácido graxo; **(b)** diacilglicerol em monoacilglicerol e ácido graxo e **(c)** monoacilglicerol em glicerol e ácido graxo.

FONTE: Costa e De Amorim, 1999. Figura adaptada.

Figura 3. Reações de síntese mediada por lipases: **(a)** esterificação – formação de éster a partir de um ácido carboxílico na presença de álcool, **(b)** amidação – formação de amida a partir de um ácido carboxílico na presença de amina, **(c)** tioesterificação – formação de tioéster a partir de um ácido carboxílico na presença de um grupo tiol.

FONTE: Borrelli e Trono, 2015. Figura adaptada.

Figura 4. Reações de transesterificação mediadas por lipases, através de diferentes mecanismos (a) acidólise, (b) amidólise, (c) alcoólise, (d) interesterificação.

FONTE: Borrelli e Trono, 2015. Figura adaptada.

A principal função fisiológica das lipases em seres vivos resume-se ao metabolismo de lipídeos e lipoproteínas; em plantas, as lipases também possuem importante função na germinação de sementes, rearranjo e degradação da clorofila e o amadurecimento dos frutos. Nos microrganismos, especialmente os fungos, as lipases participam no crescimento através da obtenção de nutrientes a partir da hidrólise de triglicerídeos, na patogenicidade e virulência. As lipases têm papel importante na adesão, colonização e invasão dos microrganismos. Para os fungos fitopatógenos, como *Fusarium graminearum* e *Botrytis cinerea*, a participação das lipases ocorre na degradação de substratos presentes nas células das plantas como as ceras cuticulares (cutina), lipídeos celulares (fosfo e glicolipídeos) e óleos/gordura presentes em sementes como fonte energética de reserva (CASAS-GODOY et al., 2012; GUPTA et al., 2015; NGUYEN; HANOI, 2008).

Peptidases

As peptidases são responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas de proteínas e peptídeos (BARRET, 2001). Atualmente, protease é a denominação mais utilizada para referir-se a este tipo de enzima, além do uso de proteinase e enzimas proteolíticas. Entretanto, o Comitê de nomenclatura da União Internacional

de Bioquímica e Biologia molecular, a fim de unificar a propagação do conhecimento, recomenda a utilização de peptidase (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007).

Estas enzimas são abundantes e essenciais para manutenção da vida, com funções em diferentes processos biológicos desde os mais rudimentares, como a digestão de alimentos para obtenção de fonte nutritiva, a mais específicos como a reciclagem de proteínas intracelulares. Assim, pelo menos 2% dos genes de todos os organismos vivos já sequenciados, codificam esta subclasse enzimática (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007).

Em fungos patógenos, as peptidases têm papel vital no processamento proteico após a secreção, como a germinação, esporulação, formação do micélio aéreo, nutrição e adaptação a diferentes ambientes (CHANDRASEKARAN; SATHIYABAMA, 2014). Em fungos fitopatógenos, estas enzimas são responsáveis pela remoção de proteínas anormais ou não funcionais, ativação/inativação de proteínas específicas e processos autolíticos. As peptidases também são responsáveis pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática da planta, sugerindo que elas podem ter um papel crítico na fitopatogênese (SOBERANES-GUTIÉRREZ et al., 2015). Além disso, polipeptídeos liberados pela ação das peptidases fúngicas podem atuar como padrões moleculares associado a danos, que são subsequentemente reconhecidos pelo sistema imune, induzindo a resposta imunológica em plantas (CHALFOUN et al., 2013; CHANDRASEKARAN et al., 2016).

Nos processos patológicos ou fisiológicos, são produzidas uma série de peptidases com diversos perfis, para tanto, percebeu-se a necessidade de uma classificação específica destas enzimas, apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Definição e classificação de peptidases.

Definição		Classificação					
Origem	Fonte de obtenção das enzimas.	Animal		Vegetal		Microbiana	
pH	pH ótimo de atividade catalítica.	Ácida		Neutra		Alcalina	
Ação catalítica	Seletividade quanto a posição que as peptidases exibem para hidrólise de uma ligação peptídica na cadeia proteica (substrato).	Endopeptidase → atuação interna na proteína em ligação alfa-peptídicas afastadas das porções N- e C-terminal e quando em peptídeos elas são chamadas de oligopeptidases;		Omegapeptidases → ação é também interna, porém próximas as regiões N- ou C-terminal, onde hidrolisam ligações alfa-peptídicas ou isopeptídicas ligadas diretamente ou não às regiões terminais;		Exopeptidases → atuação requer que uma das regiões N- ou C-terminal esteja livre e ocorre em até três resíduos a frente da região terminal, elas podem ser subdivididas ainda em aminopeptidase, carboxipeptidase, dipeptidil-peptidases, peptidil-dipeptidases, tripeptidilpeptidases e dipeptidases.	
Natureza do sítio catalítico	Presença de um aminoácido nucleófilo ou metal pertencentes ao sítio catalítico e que participam diretamente da hidrólise da ligação peptídica.	Serino	Treonino	Cisteína	Aspartil	Glutâmico	Metalo
Estrutural	As enzimas são divididas em famílias que pertencem a clãs (peptidases que surgiram a partir de uma única origem evolutiva).	Clã → Família → Espécie → Proteína					

FONTES: Da Silva-Lopez, 2010; Palma et al., 2002; Rao et al., 1998; Rawlings; Morton; Barrett, 2007.

As peptidases possuem diferentes conformações, dentre elas a de α/β hidrolase, assemelhando sua estrutura à discutida anteriormente (Item 1.1.1). A tríade catalítica é formada por diversas combinações, uma vez que as peptidases possuem pelo menos quatro diferentes nucleófilos (Ser, Cys, Thr, H_2O). Seu mecanismo catalítico (figura 5) se aproxima ao de uma reação ácido-base, onde se vê também a necessidade de um “*oxyanion hole*” para estabilização dos intermediários da reação (RAWLINGS; MORTON; BARRETT, 2007).

Figura 5. Representação do mecanismo catalítico de serino peptidases na hidrólise de ligações peptídicas.

FONTE: Berg, Tymoczko e Stryer, 2010. Figura adaptada.

O sítio catalítico das peptidases é localizado em um sulco na superfície da proteína, e a especificidade é ditada pela ligação do substrato ao longo do sulco em um ou ambos os lados do sítio catalítico que é responsável pela hidrólise do substrato. A presença de um nucleófilo é essencial para a atividade catalítica, porém a presença de outros resíduos torna-se importante para manter a estrutura do sítio. As regiões pertencentes ao sítio catalítico são conservadas, para tanto determinante para especificidade da enzima. O modelo utilizado para descrever esta especificidade foi determinado por Schechter e Berger (1967), onde o sítio catalítico

foi dividido em subsítios $S_1, S_2 \dots S_n$ em direção à região N-terminal e $S'_1, S'_2 \dots S'_n$ em direção à região C-terminal, que correspondem a um resíduo respectivo de aminoácido no substrato $P_1, P_2 \dots P_n$ e $P'_1, P'_2 \dots P'_n$, sendo o sítio de clivagem entre P_1 e P'_1 (figura 6).

Figura 6. Representação do sítio catalítico das peptidases, baseado no modelo de Schechter e Berger.

FONTE: Schechter e Berger, 1967. Figura adaptada.

Aplicações biotecnológicas – Lipase e Peptidase

Além de suas funções biológicas, as lipases e peptidases possuem diversas aplicações industriais.

Indústria alimentícia

Ambas enzimas são utilizadas na obtenção de produtos lácteos, como queijo, na coagulação do leite, modificação de gorduras e óleos, produção de leites e alimentos para bebês. Além de obtenção de lipídeos estruturados (lipases), peptídeos livres biologicamente ativos e produtos que têm sido empregados como importante fonte de aminoácidos em casos de intolerância infantil a proteínas do leite (peptidases) (RAO et al., 1998; SINHA; SINHA, 2009).

Na panificação, as peptidases são aplicadas 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). E as lipases são usadas como emulsificadores na melhoria de produtos de panificação e massas (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007).

A alteração de sabores em alimentos, a fim de torná-los mais aprazíveis ocorre pela ação das duas subclasses de enzimas. No caso das peptidases, a sua

aplicação promove o melhoramento do sabor de hidrolisados proteicos, que em geral apresentam sabor amargo decorrente da liberação de resíduos peptídicos que possuem aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades e resíduo (s) de prolina em sua porção central (FITZGERALD; O'CUINN, 2006). Já as lipases, produzem ésteres de cadeias curta e média, constituintes de flavorizantes e aromas na indústria alimentícia (ARAVINDAN; ANBUMATHI; VIRUTHAGIRI, 2007).

Indústria de detergentes

O uso de enzimas na indústria de detergentes foi responsável pelo aumento expressivo destes componentes no mercado. As peptidases e lipases são aplicadas como aditivos convencionais em detergentes comuns comerciais e industriais, produtos para limpeza de roupas, alvejantes, solventes de limpeza a seco e na limpeza de lentes de contato e dentaduras além de limpeza de encanamentos (HASAN et al., 2010; KUMAR et al., 2008).

Além do uso doméstico e industrial, a adição de lipases e peptidases na limpeza de instrumentos médicos tem se tornado imprescindível, a fim de evitar a formação de biofilmes bem como infecções hospitalares (RUTALA et al., 2008).

Indústria do couro

O couro como matéria-prima é rico em diversos tipos de proteínas e lipídeos. Desta forma, a aplicação de lipases e peptidases é essencial e assegura a redução da poluição ambiental e também melhora 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). Atualmente, a utilização das lipases limita-se à etapa de calagem e na etapa de degradação de gorduras (THANIKAIVELAN et al., 2004). Enquanto as peptidases, de diversas características, são aplicadas durante todo o processo de obtenção do couro como produto final. Por exemplo, na degradação da matriz celular para dar lugar à água na primeira etapa, em seguida juntamente com lipases e produtos químicos, as peptidases limpam e relaxam o couro deixando-o pronto para curtir, que adicionados a um complexo de mais duas peptidases deixam o couro suave para terminar a sua confecção utilizando outros produtos químicos e enzimáticos (NOVOZYMES, 2013).

Indústria farmacêutica

As lipases catalisam a interesterificação e transesterificação enantiosseletiva. Na síntese orgânica, as lipases de *Candida rugosa* foram utilizadas para sintetizar a lovastatina; já a lipase de *Serratia marcescens* é utilizada na hidrólise assimétrica do éster ácido 3-fenilglicídico – intermediário na síntese do cloridrato de diltiazem. Outra aplicação é na determinação do nível de lipases no soro sanguíneo como uma ferramenta de diagnóstico para detectar condições como pancreatite aguda, lesão pancreática e doenças cardíacas. Além disso, são aplicadas em cosméticos e perfumarias, pois mostram possibilidade na produção de surfactantes e aromas (MATSUMAE; FURUI; SHIBATANI, 1993; METZGER; BORNSCHEUER, 2006; NAGAR; DWIVEDI; SHRIVASTAVA, 2013; SHARMA; KANWAR, 2014).

Já as peptidases são aplicadas na remoção de calosidade, de manchas e queloides, tratamento de queimaduras, e úlceras (SUKHOSYROVA et al., 2003); na obtenção de peptídeos que apresentam diversas atividades biológicas de interesse industrial, conduzindo para estabelecimento de uma ampla variedade de aplicações (TSURUOKA et al., 2003) e ainda como digestivo, no tratamento da acne, psoríase e doença celíaca (GUPTA et al., 2013; SHAN et al., 2004). Na cosmetologia as principais peptidases utilizadas são as collagenases e queratinases que hidrolisam as ligações peptídicas do colágeno e queratina do *estratum* córneo da pele, promovendo a renovação celular pela remoção das células mortas presentes na epiderme, levando a restauração da mesma. Também são utilizadas enzimas como a papaína, bromelina e outras peptidases para realização de alisamento e *peeling* (LODS et al., 2000; SIM et al., 2000).

Biorremediação

As lipases e peptidases são enzimas que podem ser usadas em conjunto no tratamento de diversos efluentes contaminados com material proteico e lipídico, desde o esgoto doméstico a efluentes de indústrias alimentícias, do couro e abatedouros em geral.

As peptidases são utilizadas para degradação de proteínas fibrosas de animais tais como penas, chifres, cabelos e unhas. A ação das peptidases sobre estes resíduos, disponibiliza material que pode ser empregado para o processamento de

cola de uso em carpintaria e suplemento proteico de ração animal (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1998). Peptidases alcalinas têm sido utilizadas no tratamento de resíduos da indústria de alimentos e esgoto doméstico com a finalidade da degradação de penas e pêlos de forma mais limpa e eficaz (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

As lipases têm sido utilizadas no tratamento de lodo ativado, onde camadas finas de gorduras devem ser continuamente removidas da superfície de tanques arejados para permitir transporte de oxigênio, além de remoção de outros lipídeos presentes no efluente contaminado (GANDHI, 1997). Estas enzimas ainda são utilizadas como indicador de poluição do solo fértil e infértil por hidrocarbonetos, onde a presença de uma atividade maior indica a degradação do poluente (MARGESIN; ZIMMERBAUER; SCHINNER, 1999).

Indústria têxtil

A utilização de peptidases na indústria têxtil é uma alternativa a processos já estabelecidos, porém com alto impacto ambiental. O uso destas enzimas no tratamento anti-encolhimento da lã, vem sendo extensivamente estudado, e demonstrou resultados promissores (ARAÚJO; CASAL; CAVACO-PAULO, 2008). No tratamento da seda, as peptidases são aplicadas na etapa de degomagem. Uma vez que o processo químico também afeta a estrutura da seda, a utilização de enzimas proteolíticas demonstrou-se adequada, pois é específica à proteína (sericina) a ser removida (RAJASEKHAR et al., 2011).

Na produção de fibras sintéticas, as lipases são aplicadas a fim de modificar a superfície destas fibras, aumentando a hidrofiliabilidade e consequentemente auxiliando na coloração e conforto destes tecidos (ARAÚJO; CASAL; CAVACO-PAULO, 2008).

Outras aplicações

Além das aplicações acima apresentadas, ambas enzimas são utilizadas em diversos outros campos. Tanto as peptidases, quanto as lipases são utilizadas em conjunto a carboidrases a fim de aumentar a digestibilidade na alimentação de animais para abate (PARIZA; COOK, 2010).

As peptidases têm sido aplicadas na recuperação de prata pela digestão de gelatina (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002), na etapa de fermentação na produção de etanol e redução de viscosidade causada por proteínas em diferentes processos industriais (NOVOZYMES, 2013).

As lipases, em contrapartida, possuem aplicações que abrangem a produção de lubrificantes, biodiesel e bioquerosene a partir de fontes renováveis através da transesterificação de fontes vegetais/animais, e aditivos que diminuem a viscosidade do biodiesel (JAEGER; EGGERT, 2002). Na indústria de papel, pela remoção de triglicérides e ceras, consequentemente aumentando o branqueamento e reduzindo a poluição de efluentes (CASAS-GODOY et al., 2012), além da produção de biopolímeros, biosensores, modificação de ácidos fenólicos e antioxidantes.

A obtenção de lipases e peptidases para uso comercial é realizada principalmente a partir de fungos, leveduras e bactérias, em sua maioria por expressão heteróloga em bioprocessos submersos, com a finalidade de aumentar o rendimento e facilitar a obtenção dessas enzimas. O grau de pureza é dependente do objetivo da aplicação, se esta é para uso como medicamento/cosmético ou o contaminante pode modificar o produto, como por exemplo em alimentos, a enzima deve ter um grau de pureza alto. Em contrapartida se a presença de outros contaminantes não afeta o processo de obtenção do produto ou a aplicação do mesmo, o grau de pureza pode ser menor (CASAS-GODOY et al., 2012; LADEIRA et al., 2010).

Bioprocessos

As enzimas podem ser produzidas através de bioprocessos sólido e submerso. O bioprocessos sólido é amplamente utilizado na Ásia para obtenção de alimentos fermentados e outros produtos como o ácido itacônico e cítrico, esta estratégia também vem sendo estudada para a produção de enzimas e outros metabólitos. Apesar de ser uma metodologia com potencial aplicação, é necessário desenvolvimento na padronização do meio, escalonamento e recuperação do produto (NOUT; AIDOO, 2012; RAIMBAULT, 1998).

Em contrapartida, o bioprocessos submerso é a metodologia mais difundida e aplicada na produção de enzimas. Nela, o microrganismo é inoculado a um meio-de-cultura líquido cuja formulação é composta por fontes de carbono e nitrogênio

orgânicas e inorgânicas dissolvidas ou suspensas na solução e condições conhecidas (temperatura, aeração, pH, entre outros). As principais vantagens apresentadas por este método são, a fácil recuperação e purificação do produto, o controle de suas condições com exatidão e facilidade no manuseio e manutenção do bioprocessamento como um todo. Além de serem utilizados para produção de proteínas e metabólitos nativos, o bioprocessamento submerso é a escolha adequada para expressão heteróloga de proteínas recombinantes (HANSEN et al., 2015).

Microrganismos

Os microrganismos são fatores determinantes no desenvolvimento da biotecnologia e tecnologia enzimática. Os principais microrganismos utilizados são as bactérias, leveduras e fungos filamentosos, nas formas nativa isolada, mutantes selecionados em laboratório ou ainda geneticamente modificados para a técnica de DNA-recombinante.

A produção de enzimas por microrganismos é considerada mais vantajosa que a produção por plantas e animais. Uma vez que um mesmo microrganismo é capaz de produzir uma diversidade grande de enzimas dado um estímulo específico. Além disso, as etapas de produção e condições de crescimento podem ser facilmente controladas, e uma vez determinadas, o escalonamento e aumento de rendimento tornam-se viáveis e reprodutíveis. As enzimas microbianas possuem uma grande diversidade bioquímica e podem ser produzidas utilizando diferentes matérias-primas, ademais, os microrganismos e suas proteínas são passíveis de manipulação genética a fim de melhoramento de características desejadas (VERMELHO et al., 2013, 2016).

Dentre os microrganismos mais utilizados, os fungos filamentosos e leveduras apresentam as vantagens de secretar as proteínas de interesse e de possuírem um maquinário mais complexo, capaz de realizar modificações pós-traducionais, e consequentemente produzir um portfólio extenso de proteínas. Além disso, atualmente um grande número de espécies têm sido aprovadas pelas autoridades reguladoras como cepas GRAS (*generally recognized as safe*) (QUINTANILLA et al., 2015).

Fusarium oxysporum

O gênero *Fusarium* abrange inúmeras espécies de fungos produtores de macronídios de forma fusóide. Elas são amplamente distribuídas no solo, em partes de plantas subterrâneas e aéreas, detritos de plantas e outros substratos orgânicos, bem como na água em geral. Este gênero já foi isolado em regiões inóspitas a regiões habitáveis, esta distribuição ampla pode ser atribuída a sua facilidade de crescimento em diversos substratos e seu mecanismo eficiente de distribuição (DI PIETRO et al., 2003; LEVIC et al., 2009).

As espécies de *Fusarium* sp são amplamente conhecidas pela capacidade de causar grande prejuízo à agricultura, indústria de alimentos e pecuária, através da destruição de plantações, vegetais armazenados e/ou produtos acabados (produção de micotoxinas), ou ainda causando infecções em animais acarretando na morte de gado de corte. Além disso, podem causar infecções em humanos, principalmente em pacientes imunocomprometidos, e em casos de imunocompetentes ocorrem casos de infecções superficiais ou sinusite, além de intoxicação pela ingestão de alimento contaminado (NUCCI; ANAISSIE, 2007).

Uma das espécies mais conhecidas e comuns deste gênero é conhecida como *Fusarium oxysporum* (Figura 7). Este fungo saprófito tem reprodução predominantemente assexuada, e é capaz de invadir raízes causando podridão e murchidão pela colonização do xilema. Estudos moleculares da patogenicidade deste microrganismo apontaram que ele tem um número limitado de hospedeiros, principalmente tomate, melão, feijão, banana, algodão, grão de bico e *Arabidopsis thaliana* (MICHIELSE; REP, 2009).

Figura 7. Fotografia de *Fusarium oxysporum* após 72 h de crescimento em ágar batata dextrose a 30 °C.

FONTE: Próprio autor.

Este fungo é conhecido por possuir cepas não-patogênicas e patógenos de plantas e humanos. Os causadores da patogenicidade deste microrganismo ainda não estão completamente claros, porém a produção de enzimas que degradam a parede celular tem sido considerada como um fator importante para invasão do fungo no hospedeiro. Diversas classes são conhecidas por participarem desta etapa da infecção, principalmente as hidrolases (TEN HAVE et al., 2002).

Além das diversas características apresentadas, o fungo *F. oxysporum* é interessante para aplicações biotecnológicas. Diversos estudos têm sido direcionado na produção de nanopartículas de prata com intuito de diferentes aplicações, tais como eletrônicos, biosensores, estoque de alimentos e ainda na área farmacêutica (BIRLA et al., 2013; ISHIDA et al., 2014). Outra área de interesse, abrange o uso deste microrganismo na produção de bioetanol, onde resultados promissores foram encontrados na conversão simultânea de D-xilose e celulose em etanol (SINGH; KUMAR, 1991). Diversos trabalhos foram publicados mostrando a capacidade deste fungo na produção de enzimas de interesse biotecnológico tais como as pectinases (MEHTA; MEHTA, 1985), amilase (KWON et al., 2007), xilanases, celulasas (PANAGIOTOU et al., 2003), peptidases (BARATA et al., 2002) e lipases (DOS PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006; GOPINATH et al., 2013).

Expressão heteróloga – *Pichia pastoris*

A produção de enzimas para aplicação biotecnológica ocorre na forma nativa ou através de expressão heteróloga. A forma nativa é utilizada em algumas aplicações industriais, porém a tecnologia de DNA recombinante foi desenvolvida a fim de facilitar e aumentar a produção de proteínas alvos, bem como padronizar os processos de obtenção. Nesta técnica, o DNA de interesse é clonado em um vetor e replicado em um microrganismo hospedeiro (expressão heteróloga). O DNA clonado inclui técnicas em genética molecular, sequenciamento, expressão e purificação. A junção destas tecnologias tem sido a base da indústria biotecnológica.

Os sistemas de expressão para proteínas recombinantes consistem essencialmente de um maquinário celular capaz de produzir proteínas, um vetor que possibilita a introdução de material genético na célula, com partes reguladoras que proporcionam a replicação do material genético e marcadores de seleção. Por fim, um cassete de expressão, que é incorporado ao vetor que possibilita a transcrição e tradução do material genético em proteína (FISHER; GUTTIERI; LIANG, 2016).

As bactérias, principalmente *Escherichia coli*, foram os primeiros microrganismos utilizados para expressão de proteínas recombinantes, porém o uso de leveduras tem crescido intensivamente, pois possuem as mesmas vantagens genéticas que a *E. coli*, incluindo uma riqueza de informação genética/fisiológica e sequências genômicas completas, uma variedade de promotores e kits de expressão comercialmente disponíveis. Além disso, possuem como vantagens o alto rendimento e produtividade, cepas de produção GRAS estáveis, crescimento de alta densidade e rápido em meio de cultura definido, capacidade de glicosilar proteínas e produzi-las na conformação ideal (DEMAIN; VAISHNAV, 2009; MCDONALD et al., 2011).

A *Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica que pertence à classe *Ascomycetes* e atualmente, é um dos principais sistemas de expressão para a produção de proteínas heterólogas (BATT et al., 2001). Esta levedura utiliza o metanol como fonte de carbono, e o metaboliza através da presença da enzima álcool oxidase, codificada pelos genes AOX1 e AOX2. O gene AOX1 é responsável pela maior geração da enzima AOX na célula e é o principal contribuinte para o metabolismo do metanol, enquanto o gene AOX2 tem pouca participação neste metabolismo (CREGG, 1989). Existem diferentes cepas desta levedura usadas na

expressão heteróloga, denominadas como Mut⁺, Mut^s e Mut⁻. A Mut⁺, é caracterizada por utilizar metanol na mesma taxa de consumo que a cepa selvagem, uma vez que possui ambos genes AOX1 e 2 ativos. No tipo Mut^s, o gene AOX1 foi modificado pela inserção do gene ARG4 (proveniente da levedura *Sacharomyces cerevisiae*), causando uma ruptura, logo as células metabolizam o metanol pela regulação do gene AOX2, conseqüentemente o consumo de metanol é mais lento. Já a cepa Mut⁻, é incapaz de crescer em metanol, uma vez que ambos genes AOX foram eliminados (MACAULEY-PATRICK, 2005).

Diversas são as estratégias para expressão de proteínas heterólogas em *P. pastoris*, dentre elas a utilização de vetores com promotores altamente regulados, como o promotor de AOX1 tem sido atraente. Estes possuem como vantagem a separação da etapa de crescimento da biomassa e a fase de expressão da proteína heteróloga. Logo, as células não são sofrem pelo acúmulo de proteína recombinante durante a fase de crescimento (AHMAD et al, 2014).

Engenharia de proteína

O papel da engenharia de proteína é de superar as limitações de enzimas naturais. O desenvolvimento das técnicas já citadas viabilizou o escalonamento na produção de enzimas. O aumento no interesse na aplicação destas no âmbito industrial e doméstico estimula o surgimento de metodologias capazes de modificar estes biocatalizadores a partir da manipulação de suas sequências e estruturas criando enzimas com propriedades novas ou melhoradas (KUMAR; SINGH, 2013).

Existem duas estratégias principais para engenharia de proteína, a primeira compreende no design racional que inclui o estudo estrutural e funcional da proteína a fim de modificá-la da forma desejada, e a segunda mimetiza o processo natural de evolução, conhecida como evolução direta, a qual consiste em uma mutagênese randômica, e posterior escolha dos mutantes com a proteína desejada (ARDNT; MULLER, 2007).

O “engenheiramento” e criação de novas enzimas é um atalho para a evolução, um destes caminhos possíveis de seguir é a criação de enzimas híbridas – também chamadas de quimeras – combinando duas ou mais sequências, a fim de melhorar ou criar novas funcionalidades. Considera-se que uma enzima híbrida é composta por elementos de mais de uma enzima. Assim, podem ser geradas de várias

maneiras: uma enzima existente pode ser alterada por uma única mutação pontual (ou série de mutações pontuais) com base em estruturas existentes numa segunda enzima, podem ser trocados elementos estruturais secundários ou domínios inteiros de enzimas, ou unidades monoméricas de enzimas multiméricas e também fusões entre duas enzimas que possuem atividades distintas (NIXON; OSTERMEIER; BENKOVIC, 1998).

Na junção de duas enzimas diferentes, duas técnicas principais são utilizadas para a fusão de seus respectivos genes. A primeira, chamada de inserção, um dos domínios é inserido *in-frame* em dois locais de ligação dentro de outro domínio, esta técnica gera formas proteicas mais rígidas, estáveis e resistentes à clivagem proteolítica (DOI; YANAGAWA, 1999). A segunda e mais difundida, é determinada como fusão *end-to-end*, onde há uma ligação na região N-terminal de uma proteína à região C-terminal de outra proteína de interesse, através de um *linker*. Sua principal vantagem é a independência quanto a conformações e estruturas das proteínas quando comparada à técnica de inserção, tornando o processo mais simples (RIZK; ANTRANIKIAN; ELLEUCHE, 2012; YOURNO; KOHNO; ROTH, 1970).

Diversos estudos demonstraram a utilização desta última técnica, a fim de criar enzimas multifuncionais com o objetivo de aplicações biotecnológicas, como observamos na Tabela 2.

Tabela 2. Levantamento de enzimas bifuncionais originárias de microrganismos e suas potenciais aplicações

Enzimas	Microrganismo(s) origem	Aplicação	Autores
D-hidantoinase e N-carbamilase	<i>Bacillus stearothermophilus</i> / <i>Bacillus thermocatenulatus</i> e <i>Agrobacterium sp</i>	D-aminoácidos	Kim et al., 2000
β -glucanase e xilanase	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Biocombustível	Lu et al., 2006
Endoglucanase e fitase	<i>Bacillus subtilis</i>	Nutrição animal	Reddy et al., 2009
α -galactosidase e sucrose quinase	<i>Ruminococcus gnavus</i> E1	Metabolismo	Bruel et al., 2011
Lacase e β -1,3–1,4-glucanase	<i>Bacillus subtilis</i>	Biocombustível	Furtado et al., 2013
α -1,3-glucanase e α -1,6-glucanase	<i>Paenibacillus humicus</i> e <i>Streptococcus mutans</i>	Odontologia	Otsuka et al., 2015
Endoglucanase e β -glucosidase	<i>Fervidobacterium gondwanense</i> e <i>Fervidobacterium islandicum</i>	Biocombustível	Rizk et al., 2015

A geração destas enzima bifuncionais tiveram como objetivos, o aperfeiçoamento de processos a partir da degradação simultânea de substrato, bem como melhoramento das características das enzimas em questão favorecendo as suas respectivas reações catalíticas

De forma geral, as peptidases e lipases são enzimas ricas em aplicações e para tanto é necessário conhecer suas características, bem como sua forma de produção e purificação a fim de delinear a necessidade de manipulação de sua estrutura além de determinar seu respectivo uso.

OBJETIVOS

Capítulo 1

Objetivo geral

O objetivo geral deste capítulo foi a produção nativa por *F. oxysporum* e purificação das enzimas lipase e peptidase, bem como a caracterização de ambas.

Objetivos específicos

- Obtenção de peptidase e lipase nativas do fungo *F. oxysporum* por bioprocessos submersos;
- Realizar a purificação dessas enzimas nativas utilizando técnicas cromatográficas;
- Caracterização bioquímica das enzimas nativas, utilizando substratos peptídicos de supressão intramolecular de fluorescência (FRET) para peptidase e substrato 4-metilumbeliferil-butirato para lipase;
- Determinação da especificidade da peptidase

Capítulo 2

Objetivo geral

O objetivo geral deste capítulo foi a produção de uma quimera composta por uma lipase e uma peptidase, expressa em *Pichia pastoris*, e estudos bioquímicos funcionais com possíveis aplicações biotecnológicas.

Objetivos específicos

- Busca no banco de dados a fim de determinar sequências de peptidase e lipase promissoras para obtenção de uma enzima bifuncional;
- Construção da sequência completa da quimera e expressão em *Pichia pastoris*;
- Separação de peptidase e lipase e expressão heteróloga;
- Purificação das enzimas heterólogas e quimera por processos cromatográficos;
- Caracterização bioquímica da quimera, bem como das enzimas separadas (não foi possível realizar esta etapa).

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A descoberta de novas enzimas pode gerar conhecimento quanto ao seu perfil de produção por um dado fungo em determinadas condições de cultivo, e o papel destas enzimas na fisiologia deste fungo. Além disso, através da caracterização destas enzimas, podem ser determinadas aplicações biotecnológicas em novos processos ou melhorar aqueles existentes. Ou ainda, podem ser consideradas como alvo terapêutico ou de controle biológico, caso o fungo seja patógeno de animal e/ou plantas.

Para tanto, utilizamos o fungo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, amplamente estudado tanto em produção enzimática para aplicação biotecnológica, quanto em estudos a fim de determinar fatores virulência e mecanismos de infecção a diversas plantações, na produção de peptidase e lipase em bioprocessos submersos na presença de substratos insolúveis.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Identificação e manutenção do microrganismo

O fungo *F. oxysporum* foi isolado de matéria orgânica no solo e identificado pelo grupo da Professora Dr^a Cristina Maria de Souza Motta responsável pela micoteca da Universidade Federal de Pernambuco - Brasil. Este fungo pertence à coleção de microrganismos do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral. Esta cepa está depositada sob o número URM 7401, na micoteca da UFPE. A cepa foi cultivada em placas de Petri (100 mm de diâmetro) preenchidas com meio cultura *PDA* (*Potato Dextrose Agar*) a 30 °C, mantidas refrigeradas a 4 °C e repicadas a cada dois meses.

2.2. Preparo do inóculo

F. oxysporum não demonstrou produção viável de esporos em meio *PDA*, impossibilitando a utilização de concentração de esporos como forma de inóculo, desta forma, utilizamos a fragmentação do micélio como alternativa. O fungo foi então cultivado em placas de Petri com meio *PDA* por 96 horas a 30 °C e posteriormente foi fragmentado em discos de 5 mm com remoção do meio de cultura adjacente (YADAV; SARKAR, 2014).

2.3. Bioprocesso submerso

Para produção de peptidase e lipase foi realizado um *screening* de possíveis meios de produção, a fim de selecionar os meios mais adequados para obtenção de ambas enzimas.

Em frascos erlenmeyer de 250 mL foram colocados 50 mL de meio de cultura com as seguintes composições, baseadas em Tran e Nagano (2002):

Meio de cultura para produção de lipase → KH_2PO_4 0,2%; K_2HPO_4 0,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; NaCl 0,2%; extrato de levedura 0,1%; caseína 0,1%; peptona 0,1% e farelo de trigo 1,0% → pH 6,0.

Meio e cultura para produção de peptidase → KH_2PO_4 0,2%; K_2HPO_4 0,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; Citrato de sódio 0,5%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; extrato de levedura, 0,01%; carboximetilcelulose 0,01%; peptona 0,05% e farinha de pena 0,2% → pH 6,0.

Após a seleção dos meios adequados a cada enzima, também foi realizado o bioprocesso com o meio de cultura sem a indução da farinha de pena ou farelo de trigo, a fim de determinar a influência destes materiais na produção enzimática.

Os meios foram autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Cada frasco foi inoculado com 15 discos do fungo *F. oxysporum* e a seguir incubados a 30 °C ± 2 °C em câmara incubadora com agitação orbital de 120 rpm, durante 168 horas. A cada 24 horas um frasco foi retirado e os extratos obtidos foram analisados quanto a sua atividade proteolítica e lipolítica.

2.4.Processos de purificação

As proteínas possuem características próprias e ímpares, desta forma os processos de purificação são singulares a cada uma. Nesta etapa fizemos inúmeros protocolos para purificação destas enzimas, ao fim utilizamos métodos conhecidos de exclusão de massa e troca iônica.

2.4.1. Lipase

O protocolo de purificação (figura 8) foi realizado utilizando uma coluna Tricorn 5/50 preenchida com resina aniônica Source 15Q acoplado ao sistema *Akta Purifier* UPC 10. A resina foi equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,1 e o gradiente de sal foi crescente utilizando tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,1 adicionado de 500mM de NaCl. O volume de 1,5 mL do extrato bruto adicionado de 0,5 mL de tampão Tris-HCl 150mM pH 8,1 foi aplicado e um gradiente de sal não linear foi estabelecido, a primeira etapa de lavagem foi seguida por um gradiente curto de sal até 35% e posterior gradiente estendido até 100% de NaCl.

As frações coletadas foram submetidas a ensaios de atividade lipolítica com substrato p-nitrofenil palmitato (item 2.6). Os tubos com atividade positiva foram analisados quanto ao perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida

desnaturante (SDS-PAGE) 12% e corados com nitrato de prata para certificação do perfil de proteínas (LAEMMLI, 1970; SEE, Y. S.; JACKOWSKI, 1989).

Figura 8: Esquema ilustrativo das etapas envolvidas no processo de purificação da lipase nativa produzida por *F. oxysporum* em bioprocesso submerso.

FONTE: Akta, 1992, 2015; Google imagens. Figura adaptada pelo próprio autor.

2.4.2. Peptidase

O processo de purificação (figura 9) iniciou-se pela precipitação de 20 mL de extrato bruto adicionado de 70% de sulfato de amônio e mantido durante 3 horas a 4°C, a amostra foi então centrifugada a $10000 \times g$ por 15 minutos a 4 °C e ressuspensa em 2,5 mL de água. O extrato precipitado foi submetido à purificação por exclusão de massa, onde 2 mL foram aplicados a uma coluna de vidro (100 x 4 cm) preenchida com resina Sephadex G-50 (faixa de fracionamento 1000 a 30000 Da) equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e 50 mM NaCl. A vazão do tampão foi fixada a 0,6 mL/min e mantida por bomba peristáltica, sendo coletados 5 mL por tubo em ambiente refrigerado a 4 °C, utilizando coletor de frações. As amostras dos tubos foram submetidas à determinação de atividade proteolítica com substrato caseína (item 2.7), os tubos que apresentaram atividade foram analisados quanto ao perfil proteico por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 12% e corados com nitrato de prata para certificação do perfil de proteínas (LAEMMLI, 1970; SEE, Y. S.; JACKOWSKI, 1989). Baseado nas massas moleculares do padrão de bandas proteicas (LMW – *Low molecular weight* – GE Healthcare Life Science), a massa das proteínas foi estimada com o auxílio do software Image Lab™ version 3.0 (BIO-RAD). As frações contendo atividade proteolítica foram divididas em lotes de acordo com o perfil proteico obtido por SDS-PAGE e então a amostra purificada foi dialisada contra água, a fim de obter amostra para caracterização bioquímica.

Figura 9: Esquema ilustrativo das etapas envolvidas no processo de purificação da peptidase nativa produzida por *F. oxysporum* em bioprocesso submerso.

FONTE: Google imagens. Figura adaptada pelo próprio autor.

2.5.Quantificação de proteína total

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

2.6.Avaliação da atividade lipolítica com substrato *p*-nitrofenil palmitato

A utilização do substrato *p*-nitrofenil palmitato (*p*-NPP) é adequado para avaliação de atividade lipolítica, uma vez que a lipase promove a hidrólise do substrato em *p*-nitrofenol, produto colorimétrico (figura 10).

Figura 10. Mecanismo de ação da lipase na hidrólise do substrato *p*-nitrofenil palmitato.

FONTE: Novozymes, 2016.

A atividade lipolítica foi determinada de acordo com o protocolo de Kanwar et al. (2005) com modificações, para avaliação da atividade após cada etapa do bioprocesso e purificação. O substrato *p*-NPP 20 mM foi solubilizado em 2 mL de isopropanol, esta solução foi adicionada à 18 mL de emulsão preparada em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 composta por 10 mg de goma arábica e 50 µL de Triton X-100. A interrupção da reação enzimática foi realizada pela adição de solução de etanol:acetona (1:1) a -20 °C. Os tubos de reação foram centrifugados para

eliminação de precipitado a $10.000 \times g$, por 5 minutos, à temperatura ambiente. A absorbância do sobrenadante foi determinada por espectrofotometria em comprimento de onda 410 nm, contra seus respectivos brancos (realizado a partir da inativação da enzima por fervura e todos os outros componentes da reação).

Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de *p*-nitrofenol liberado pela hidrólise do *p*-NPP por 1 mL de enzima sob condições definidas de ensaio (KANWAR et al., 2005).

2.7.Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína

A atividade proteolítica foi verificada a cada etapa do bioprocessamento e purificação, segundo o protocolo descrito por Sarath et al (2001), com modificações pertinentes aos diferentes ensaios. A reação foi realizada a 45 °C com extrato enzimático/frações de purificação – 100 a 200 µL – tampão fosfato monobásico 50 mM pH 6,5 – 100 µL – e substrato caseína 1% preparada no mesmo tampão – qsp 1000 µL – e para finalizar a reação foi utilizado ácido tricloroacético 10% - 600 µL. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a $10000 \times g$ a temperatura ambiente. Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos contra seus respectivos brancos (realizado pela adição prévia de TCA a fim de inativar a enzima e posterior acréscimo de todos os outros componentes da reação). em comprimento de onda 280 nm, em espectrofotômetro.

Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima requerida para liberar 1 µM tirosina/min dentro das condições de reações usando caseína como substrato (MEYERS; AHEARN, 1977).

2.8.Caracterização bioquímica funcional

Após os processos de purificação, ambas enzimas foram submetidas à caracterização bioquímica funcional utilizando substrato fluorescentes.

2.8.1. Substrato fluorescente 4-Metilumbeliferil-butirato – lipase

A utilização do substrato 4-Metilumbeliferil-butirato (MU-Bu) é adequada para avaliação de atividade lipolítica, uma vez que a lipase promove a hidrólise do substrato em 4-Metilumbeliferone, produto fluorescente (figura 11).

Figura 11. Mecanismo de ação da lipase na hidrólise do substrato 4-Metilumbeliferil-butirato.

FONTE: Roberts, 1985.

A atividade lipolítica foi baseada no protocolo de Prim et al. (2003). Os ensaios foram realizados em placas pretas de 96 poços, a fluorescência causada pela hidrólise do substrato fluorescente foi medida a $\lambda_{\text{ex}} = 365 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{em}} = 445 \text{ nm}$. A mistura da reação foi composta por 10 μL de extrato enzimático/frações de purificação, 2 μL de substrato MU-Bu 10 mM preparado em DMSO e tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (qsp 200 μL) a 35 °C por 10 minutos. A reação e leitura foram realizadas utilizando espectrofluorímetro Biotek Synergy com leitor de placa.

2.8.2. Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência – peptidase

A utilização de substratos peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) é ideal para determinar a especificidade de peptidase (Figura 12). Na estrutura deste substrato há um grupo emissor de fluorescência (ácido orto-aminobenzóico – Abz) na extremidade amino-terminal e um grupo supressor de fluorescência (grupo etilenodiamina-dinitro-fenil – EDDnp) na extremidade carboxi-terminal (CHAGAS; JULIANO; PRADO, 1991). Estes grupos são responsáveis pelo funcionamento do substrato, quando íntegro o grupo EDDnp suprime a fluorescência emitida por Abz. Após a ação da peptidase, há um distanciamento destes dois grupos promovendo a emissão da fluorescência com maior intensidade (CARMONA; JULIANO; JULIANO, 2009).

Figura 12. Esquema do mecanismo de hidrólise e princípio do funcionamento dos substratos peptídicos sintéticos com supressão intramolecular de fluorescência (FRET). **(A)** Substrato intacto com fluorescência suprimida dada a proximidade das extremidades de supressão de fluorescência (EDDnp) e de emissão de fluorescência (Abz); **(B)** No substrato hidrolisado ocorre o distanciamento das extremidades do peptídeo sintético contendo os grupos EDDnp e Abz o que gera o aumento da fluorescência.

FONTE: Farady e Craik, 2010. Figura modificada.

Para peptidase foi utilizado um substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência sintetizado pelo Laboratório de Biofísica molecular, UNIFESP-SP, sob responsabilidade da Professora Dra. Maria Aparecido Juliano. A reação enzimática ocorreu em cubeta de quartzo de 1 mL na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp na concentração final de $7,0 \times 10^{-4}$ mM, nas condições de reação referentes a cada parâmetro da caracterização. A avaliação da quantidade de fluorescência emitida deu-se em espectrofluorímetro modelo Lumina (Thermo), acoplado a um Peltier 4-*position fluorescence cell holder*, responsável pela agitação e temperatura da reação, nos comprimentos de onda de excitação 320 nm e emissão 420 nm. Luminous Software version 3.0 foi o software utilizado para visualização dos resultados.

Os parâmetros avaliados são apresentados a seguir:

2.8.3. Efeito do pH e temperatura na atividade enzimática

A avaliação do pH ótimo deu-se no intervalo de pH entre 3 a 11 para lipase (40 °C), utilizando uma curva de pH composta de tampões McIlvaine (3,0 a 8,0) e Glicina-NaOH (8,0 a 11,0), na concentração de 100 mM. Diferentemente a peptidase foi analisada no intervalo de pH entre 3 a 9 (50 °C), através da curva composta pelos tampões glicina-HCl (pH 3,0 – 3,5); acetato (pH 4,0 – 5,0); MES (pH 5,5 – 6,5); HEPES (pH 7,0 – 8,0) e BICINE (pH 8,5 – 9,0), na concentração de 100 mM.

A temperatura ótima foi determinada na faixa de 25 a 65 °C a reação ocorreu em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5 (lipase) e 25 a 80 °C na presença de tampão HEPES 100mM pH 7,0 (peptidase).

2.8.4. Efeito do pH e temperatura na estabilidade enzimática

A estabilidade em pH da peptidase foi realizada incubando a enzima purificada em cada pH de análise (3,0 a 10,0 – com incrementos de 1,0 unidade) a 25 °C durante o período de 60 minutos. E a estabilidade em temperatura foi determinada expondo a enzima pura às temperaturas na faixa de 45 a 70 °C, nos períodos de 5, 15, 30 e 60 minutos.

Diferentemente, a lipase foi analisada quanto à estabilidade de pH na faixa entre 5,0 a 10 (incrementos de 0,5) a 25 °C por 60 minutos. E a estabilidade em temperatura foi determinada expondo a enzima pura às temperaturas na faixa de 25 a 45 °C, no período de 5, 15, 30 e 60 minutos. Os controles foram realizados nas condições ótimas das respectivas enzimas, sem exposição prévia ao pH e temperatura.

2.8.5. Efeito de inibidores na atividade proteolítica

Os inibidores testados para determinação da classe da peptidase pura foram PMSF (Phenylmethylsulphonyl fluoride), EDTA (Ethylenediamine tetraacetic acid), ácido iodoacético (AIA) e pepstatina na concentração final de 5mM, bem como, inibidor de tripsina, quimostatina, benzamidina e ácido 6-aminohexanoico a 5µM. Em um volume final de 1mL, foram colocados 10 µL de enzima e 1-2 µL de inibidor por 5 minutos e posteriormente o substrato na concentração 7×10^{-4} mM a 50 °C. O

controle foi realizado nas condições ótimas de atividade da peptidase, na ausência de qualquer inibidor mas com a mesma exposição prévia de 5 minutos.

2.8.6. Efeito de íons, surfactantes, agentes caotrópicos e DTT na atividade enzimática

A determinação do efeito de íons para ambas enzimas, foi dada pela utilização de soluções dos seguintes sais: CuCl_2 , NiSO_4 , NaCl , LiCl , AlCl_3 , CoCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , KCl e ZnSO_4 na concentração final de 1 mM em um período de incubação prévio de 5 minutos.

O efeito dos surfactantes, Tween 80 (Tw), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Triton X-100 (Tx) e Brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) e dos agentes caotrópicos, Cloridrato/Sulfato de guanidina (Gn) e Ureia (Ur), e Ditioneitol (DTT) foram realizados em diferentes concentrações finais, de 0,01 a 1,0% e 10 a 100 mM, respectivamente. As atividades proteolíticas e lipolíticas foram realizadas da mesma forma que os ensaios anteriores.

Os controles dos ensaios foram realizados nas condições ótimas de atividade das respectivas enzimas, na ausência de qualquer surfactante/agente caotrópico/DTT mas com a mesma incubação prévia de 5 minutos.

2.9. Determinação da especificidade pela cinética enzimática – peptidase

A concentração molar da enzima foi determinada (10 μM) a partir da titulação com inibidor de tripsina, baseado em (Klemencic et al., 2000).

A determinação da especificidade da peptidase deu-se pela utilização de uma biblioteca de seis séries de substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência de sequência conhecida com substituições de diferentes aminoácidos em determinada posição: Abz-**X**LRSSKQ-EDDnp (P_3), Abz-K**X**RSSKQ-EDDnp (P_2), Abz-KL**X**SSKQEDDnp (P_1), Abz-KLR**X**SKQ-EDDnp (P'_1), Abz-KLR**SX**KQ-EDDnp (P'_2) e Abz-KLRSS**X**Q-EDDnp (P'_3). A eficiência catalítica determinada em cada posição referente a um aminoácido específico, demonstra a especificidade do subsítio (S_3 , S_2 , S_1 , S'_1 , S'_2 e S'_3) da peptidase ao aminoácido em questão. As reações foram realizadas pela adição crescente de substrato ao microambiente da cubeta de quartzo composto por tampão HEPES 100 mM pH 7,0 e enzima pura a 50

°C. Os valores cinéticos de K_M e V_{MAX} foram obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os parâmetros analisados para determinar a preferência da enzima pelos resíduos foram K_M , k_{cat} e k_{cat}/K_M .

3. RESULTADOS

3.1. Lipase nativa

3.1.1. Produção via bioprocesso submerso e purificação

A produção de lipase via bioprocesso submerso se mostrou eficiente quando adicionada de farelo de trigo em comparação com o meio padrão. Podemos observar na figura 13, que em meio padrão há um aumento crescente de atividade lipolítica, atingindo um máximo de produção por volta de 6 U/mL em 144 horas. No entanto, a adição de um suplemento (polímero/resíduo agroindustrial) modifica o perfil de produção com um aumento de aproximadamente 100 vezes, onde encontramos um pico de produção de aproximadamente 630 U/mL em 48 horas.

Figura 13. Perfil de produção de lipase em bioprocesso submerso por *F. oxysporum* cultivado em meio padrão ou meio suplementado com farelo de trigo durante 144 horas. Curva obtida a partir de atividade lipolítica utilizando p-nitrofenil palmitato como substrato.

Uma vez determinado o pico de produção, geramos um volume maior para dar sequência aos experimentos de purificação. A lipase adsorveu em resina aniônica Source 15Q em pH 8,1 e foi eluída em 500 mM de NaCl, como demonstrada no cromatograma (figura 14). De acordo com a tabela de purificação (Tabela 3), podemos observar o rendimento de 11% e índice de purificação de 0,45. O perfil proteico apresentado na figura 15, demonstra a pureza da enzima comparada ao extrato bruto e o zimograma (atividade lipolítica *in situ*) deste mesmo extrato, mostrando a presença de diferentes lipases.

Tabela 3. Parâmetros obtidos durante as etapas de purificação da lipase produzida pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando substrato p-nitrofenil palmitato.

Amostra	Volume (mL)	Atividade ($\times 10^3$ U)	Proteínas totais (mg)	AE* ($\times 10^3$ U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto Lipase	80	5184	3,86	1341,8	100%	1
	5	549	0,92	597,2	11%	0,45

Figura 14. Perfil cromatográfico e atividade enzimática das frações obtidas do processo de purificação da lipase produzida por *F. oxysporum*. A cromatografia de troca aniônica foi realizada em resina Source 15 Q equilibrada em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,1 e o eluído obtido em um gradiente crescente linear de 500 mM de NaCl. A atividade enzimática foi obtida utilizando p-nitrofenil palmitato como substrato.

Figura 15. Atividade lipolítica *in situ* e perfil de proteínas de amostras envolvidas nas etapas de purificação de lipase produzida por *F. oxysporum*. (1) Zimograma de atividade lipolítica do extrato bruto: (I) Marcador de massa molecular (II) extrato bruto. (2) Perfil de proteínas das etapas de purificação da lipase em gel desnaturante SDS-PAGE 12% corado com nitrato de prata (III) Extrato bruto fermentado (IV) Fração purificada utilizando resina aniônica 15Q. Em cada uma das imagens na raia indicada por I temos o marcador de massa molecular (LMW-SDS Marker Kit) e os respectivos padrões de bandas indicados A-97 kDa; B-66 kDa; C-45 kDa; D-30 kDa; E-20,1 kDa; F-14,4 kDa.

3.1.2. Caracterização bioquímica utilizando substrato fluorescente MU-Bu

A caracterização bioquímica funcional é determinada a fim de estabelecer as melhores condições para atividade enzimática. Podemos observar na figura 16A que em pH 10,0 a enzima atingiu seu pico máximo de atividade lipolítica, além disso a atividade tornou-se presente somente em pH acima de 7,5. Em sequência, a análise do efeito de temperatura demonstrou atividade ótima da lipase a 35 °C (figura 16B).

Figura 16. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática da lipase pura produzida pelo fungo *F. oxysporum*. **(A)** pH e **(B)** temperatura, utilizando 4-metilumbeliferil butirato como substrato.

A estabilidade da lipase frente aos parâmetros de pH e temperatura estão apresentados na figura 17. A lipase demonstrou-se estável somente em pH neutro 7,0-7,5, com baixa atividade em pH ácidos e perda da atividade em pH básicos.

Dado o perfil de temperatura ótima, as temperaturas analisadas para estabilidade foram mais amenas. Na figura 17B podemos observar que a enzima se mostrou de forma geral estável, a 45°C a atividade foi mantida por volta de 40 a 60% nos diferentes tempos de exposição, nas demais temperaturas a atividade foi mantida acima de 70%, mesmo após 1 hora de exposição. Desta forma, podemos afirmar que a lipase é estável nesta faixa de temperatura testada.

Figura 17. Efeito de pH (A) e temperatura (B) na estabilidade da lipase purificada produzida por *F. oxysporum*, utilizando 4-metilumbeliferil butirato como substrato. A atividade enzimática residual foi o parâmetro quantitativo utilizado para determinar a estabilidade enzimática. O controle foi determinado como a enzima purificada nas condições ótimas e sem exposições às diferentes temperaturas e pH.

A tabela 4 mostra a influência de íons sobre a estrutura da lipase, consequentemente promovendo modulação positiva ou negativa na atividade enzimática. Podemos observar que houve influência negativa de diversos íons, sejam eles mono, di ou trivalente. Somente na presença de NaCl a enzima não sofreu modulação negativa.

Tabela 4. Efeito de íons sobre a atividade enzimática da lipase purificada produzida pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando 4-metilumbeliferil butirato como substrato. A amostra contendo a lipase purificada foi previamente incubada com diferentes sais numa concentração final de 1 mM. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos sais.

Sais	Atividade relativa (%)
Controle	100 ± 5
NaCl	105 ± 4
MgCl ₂	46 ± 5
KCl	45 ± 1
AlCl ₃	39 ± 1
LiCl	39 ± 5
BaCl	31 ± 5
MnCl ₂	30 ± 3
FeCl ₃	17 ± 1
ZnSO ₄	16 ± 2
CuCl ₂	13 ± 5
NiSO ₄	1 ± 0,1
CoCl ₂	S/A*

*S/A: sem atividade enzimática

Os surfactantes são compostos que podem influenciar de diversas formas a atividade enzimática. O SDS, detergente aniônico, foi capaz de desnaturar e como consequência a perda da atividade enzimática na concentração de 0,1%. Em

contrapartida, os demais detergentes CTAB (catiônico), Triton X-100 e Tween 80 (não iônicos) precisaram concentrações maiores para promover uma influência negativa como o SDS, apesar de demonstrar perda de atividade desde 0,01% (figura 18).

Figura 18. Efeito de surfactantes na atividade enzimática da lipase purificada produzida por *F. oxysporum*, utilizando 4-metilumbeliferil butirato como substrato. A amostra contendo a lipase purificada foi previamente incubada com diferentes concentrações finais de surfactantes. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos surfactantes. SDS: Dodecil sulfato de sódio; Tx: Triton X-100; Tw: Tween 80; CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio.

A figura 19 evidencia a influência de diferentes agentes sulfidrílico e caotrópicos na atividade enzimática da lipase purificada. O DTT nas três concentrações analisadas desnaturou a enzima e por consequência a perda da atividade enzimática foi perdida completamente. Diferentemente, o cloridrato de guanidina (Gn) causou o decréscimo da atividade ao passo que houve aumento da concentração do agente. Porém, o perfil que se demonstrou contrário aos demais foi o uso da ureia (Ur), que causou uma diminuição na atividade em concentrações menores, e com o aumento da concentração do agente, houve um aumento na atividade.

Figura 19. Efeito de agentes caotrópicos e agente redutor na atividade enzimática da lipase purificada produzida por *F. oxysporum*, utilizando 4-metilumbeliferil butirato como substrato. A amostra contendo a lipase purificada foi previamente incubada com diferentes concentrações finais de agentes caotrópicos e redutor. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos agentes. Agentes caotrópicos – Gn: cloridrato de guanidina; Ur: ureia. Agente sulfidrílico – DTT: ditioneitol.

3.2. Peptidase nativa

3.2.1. Produção via bioprocesso submerso e purificação

Conforme a figura 20, podemos observar que o fungo *F. oxysporum* é capaz de produzir peptidase quando induzido adequadamente. No meio padrão houve um aumento crescente na atividade proteolítica com maior nível de produção de 11 U/mL em 168 horas. Em contrapartida, o bioprocesso com meio suplementado (farinha de pena) demonstrou um perfil diferenciado, iniciando com 120 U/mL em 24 horas de incubação e pico de aproximadamente 165 U/mL a partir das 72 horas, com um pequeno decréscimo a partir 96 horas.

Figura 20. Perfil de produção de peptidase em bioprocesso submerso por *F. oxysporum* cultivado em meio padrão ou em meio suplementado com farinha de pena durante 168 horas. Curva obtida a partir de atividade proteolítica utilizando caseína como substrato.

Após determinação do pico de produção, obtivemos volume suficiente para transcorrer os experimentos de purificação. O extrato bruto (figura 22a), cuja atividade específica foi de 16,6 U/mg (Tabela 5), foi precipitado (figura 22b) com 70% de sulfato de amônio. Resultados exibidos na Tabela 5, mostram que a precipitação apresentou um rendimento de 86,7% e atividade específica de 60,3 U/mg. Em seguida, o precipitado foi submetido à purificação por exclusão de massa, Sephadex G-50 de faixa entre 1500-30000 Da, onde as proteínas de maior massa eluem primeiro, seguidas pelas menores, como podemos observar no cromatograma (Figura 21) e perfil de proteínas (Figura 22c). A purificação foi dividida em lotes de acordo com o perfil proteico. O lote 2, cuja atividade específica e rendimento foram de 154,8 U/mg e 78,4%, respectivamente, foi determinado como fração pura para posteriores ensaios de caracterização. Ao final, observa-se que a enzima foi purificada 9,3 vezes (tabela 5). E a partir do marcador LMW – *Low molecular weight* (A – 97KDa; B – 66KDa; C – 45 KDa; D – 30 KDa; E – 20 KDa; F – 14 KDa), foi possível estimar que a peptidase tem uma massa aproximada de 30 KDa.

Tabela 5. Parâmetros obtidos durante as etapas de purificação da peptidase produzida pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando caseína como substrato.

Amostra	Volume (mL)	Atividade (U)	Proteínas totais (mg)	AE* (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato bruto	20	237	14,3	16,6	100,0	1
Precipitado	2,5	205	3,4	60,3	86,7	3,6
Sephadex G50	50	186	1,2	154,8	78,4	9,3

*AE – atividade específica

Figura 21. Perfil cromatográfico e atividade enzimática das frações obtidas do processo de purificação da peptidase produzida por *F. oxysporum*, utilizando caseína como substrato. A cromatografia por exclusão de massa em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 adicionado de 50mM NaCl.

Figura 22. Perfil de proteínas em gel SDS-PAGE 12% em coloração com nitrato de prata das etapas de purificação da peptidase produzida por *F. oxysporum*. As imagens indicadas apresentam as seguintes amostras: **(a)** Extrato bruto fermentado **(b)** Extrato precipitado com 70% de sulfato de amônio **(c)** Frações cromatográficas que foram divididas em Lotes 1 (parcialmente purificado), 2 e 3 (purificados). Em cada uma das imagens na raia indicada por 1 temos o marcador de massa molecular (LMW-SDS Marker Kit) e os respectivos padrões de bandas indicados A-97 kDa; B-66 kDa; C-45 kDa; D-30 kDa; E-20,1 kDa; F-14,4 kDa.

3.2.2. Caracterização bioquímica utilizando substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência

A caracterização bioquímica funcional da peptidase iniciou-se pelo efeito de pH seguido pelo efeito de temperatura na atividade enzimática. A melhor atividade proteolítica foi demonstrada em pH 7,0 (Figura 23A). A peptidase apresenta uma faixa extensa de atividade catalítica em diversas temperaturas, sendo o pico a 50°C (Figura 23B), a perda de atividade é maior a partir de 60°C.

Figura 23. Efeito de pH e temperatura sobre a atividade enzimática da peptidase pura produzida pelo fungo *F. oxysporum*. **(A)** pH e **(B)** temperatura, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R).

A proteína purificada demonstrou-se estável após 1 hora de exposição numa faixa de pH ampla (3,0 a 10,0), em temperatura ambiente, mantendo aproximadamente 70% da atividade inicial, como podemos observar na figura 24A. Quando analisada a estabilidade da enzima frente a diferentes temperaturas em tempos de exposição crescentes, a enzima foi estável mantendo acima de 80% da atividade inicial nas temperaturas de 45 e 50°C em até 60 minutos e 60-80% nas temperaturas de 55 e 60°C neste mesmo período. Somente nas temperaturas mais altas (65 e 70°C) foi observado uma perda acentuada de atividade enzimática (figura 24B).

Figura 24. Efeito de pH (A) e temperatura (B) na estabilidade da peptidase pura produzida por *F. oxysporum*, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R). A atividade enzimática residual foi o parâmetro quantitativo utilizado para determinar a estabilidade enzimática.

Afim de determinar a classe da peptidase foram realizados ensaios com diferentes inibidores, cujo resultado está demonstrado na Tabela 6.

De acordo com a inibição demonstrada pelo PMSF, a enzima é uma serino peptidase. E os inibidores específicos não foram determinantes para caracterizar a enzima de forma mais específica.

Tabela 6. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da peptidase pura produzida por *F. oxysporum*, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R). O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos inibidores.

Inibidores (5mm)	Atividade Relativa (%)
Controle	100 ±18
EDTA	103±10
Pepstatina	96±3
AIA	94±8
PMSF	1±46
Inibidores (5µm)	Atividade Relativa (%)
Benzamidina	76±0,1
Ácido 6-Aminohexanoico	62±3
Quimostatina	58±5
Inibidor De Tripsina	41±12

A Tabela 7 mostra a influência de íons na atividade proteolítica da enzima em questão. Podemos observar que na presença de íons monovalentes a atividade enzimática mantém-se como a do controle. Em contrapartida, na presença de íons bivalentes houveram três perfis diferentes: o primeiro referente aos íons Cu^{2+} e Co^{2+} , onde houve modulação negativa; o segundo refere-se à influência dos íons Zn^{2+} , Ba^{2+} e Al^{3+} (trivalente), onde a atividade não sofreu mudança; e o terceiro, na presença de Mn^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} , a atividade enzimática foi modulada positivamente.

Tabela 7. Efeito de íons sobre a atividade enzimática da peptidase pura produzida pelo fungo *F. oxysporum*, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R). A amostra contendo a peptidase pura foi previamente incubada com diferentes sais numa concentração final de 1 mM. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos sais.

Sais	Atividade relativa (%)
Controle	100±7
MnCl_2	130±6
MgCl_2	125±2
CaCl_2	125±4
BaCl_2	113±3
NaCl	101±5
KCl	101±5
AlCl_3	96±6
LiCl	93±7
CoCl_2	75±1
CuCl_2	26±4

A influência de surfactantes é um ensaio importante, pois é a partir dele que é possível a determinação de compostos compatíveis a uma possível formulação ou produto. Desta forma, podemos observar a partir de análise estatística ANOVA ($P < 0,001$), que a variação de atividade nas diferentes concentrações do detergente catiônico CTAB, não foi significativa. O detergente não iônico Triton X-100 apresentou um decréscimo de cerca de 20% na atividade enzimática em todas as concentrações apresentadas. Já o surfactante aniônico SDS, como esperado, desnaturou a proteína, logo a atividade proteolítica foi diminuída em 90% a partir da concentração de 0,1%. E o surfactante não iônico Tween 80 afetou a atividade a partir de 0,1% (Figura 25).

Figura 25. Efeito de surfactantes na atividade enzimática da peptidase pura produzida por *F. oxysporum*, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R). A amostra contendo a peptidase pura foi previamente incubada com diferentes concentrações finais de surfactantes. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos surfactantes. SDS: Dodecil sulfato de sódio; Tx: Triton X-100; Tw: Tween 80; CTAB: brometo de cetiltrimetilamônio.

O efeito de agentes caotrópicos demonstrou um aumento na atividade enzimática na presença de sulfato de guanidina (Gn) 10 a 50 mM e diminuição na presença de ureia (Ur) 100 mM (Figura 26). A atividade relativa das concentrações restantes de sulfato de guanidina, ureia e do agente sulfidrílico DTT foi acima de 80%. Não houve uma perda completa de atividade proteolítica nas concentrações utilizadas dos agentes caotrópicos.

Figura 26. Efeito de agentes caotrópicos e agente redutor na atividade enzimática da peptidase pura produzida por *F. oxysporum*, utilizando substrato peptídico sintético com supressão intramolecular de fluorescência (FRET) de sequência conhecida Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R). A amostra contendo a peptidase pura foi previamente incubada com diferentes concentrações finais de agentes caotrópicos e redutor. O controle representa a enzima purificada previamente incubada com tampão, não exposta aos agentes. Agentes caotrópicos – Gn: cloridrato de guanidina; Ur: ureia. Agente redutor – DTT: ditionitrito.

As características bioquímicas de ambas peptidase e lipase estão resumidas na tabela 12, nos apêndices.

3.2.3. Determinação de especificidade da peptidase - Cinética enzimática

O principal parâmetro para análise de especificidade da peptidase quanto as posições dos seus subsítios é a eficiência catalítica. Na figura 27 podemos observar essa eficiência em relação à substituição dos aminoácidos na posição P₁ no substrato Abz-KLXSSKQ-EDDnp. O aminoácido que gerou maior eficiência catalítica foi a lisina, seguido da fenilalanina, em contrapartida os aminoácidos apolares alifáticos, prolina e isoleucina, foram resistentes à hidrólise pela peptidase quando estão nesta posição. De acordo com o ponto de clivagem, a hidrólise do substrato ocorreu de forma uniforme entre os subsítios S₁ e S'₁. A característica de afinidade é dada pela constante K_m , apresentada nas tabelas em anexo, onde o subsítio S₁, demonstra maior afinidade pelos aminoácidos fenilalanina e lisina, nesta ordem.

Figura 27. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-KLXSSKQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P₁. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

Na figura 28 está apresentada a eficiência catalítica de cada aminoácido na posição P₂ do substrato Abz-KXRSSKQ-EDDnp referente ao subsítio S₂. Neste subsítio os aminoácidos com maior eficiência catalítica foram a isoleucina e fenilalanina, resíduos apolares, ambos com 20256 e 15627 s⁻¹.mM⁻¹ respectivamente. Os resíduos que não apresentaram atividade catalítica foram hidrofílicos carregados negativa e positivamente (ácido aspártico, histidina e lisina) e o triptofano (apolar aromático), o que demonstra uma especificidade relativa nesta posição. Os pontos de clivagem dos substratos substituídos na posição P₂, demonstraram hidrólise entre P₁ e P'₁, com exceção do substrato P₂E (ácido glutâmico), onde não foi possível determinar a preferência da enzima pelo substrato com a hidrólise entre P₁ e P'₁ e P'₁ e P'₂. Este subsítio possui maior afinidade pelos aminoácidos isoleucina e fenilalanina, respectivamente.

Figura 28. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-KXRSSKQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P₂. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

A figura 29 apresenta os parâmetros cinéticos do subsítio S₃ da peptidase referente ao aminoácido na posição P₃ do substrato Abz-XLRSSKQ-EDDnp. Os pontos de clivagem destes substratos demonstraram hidrólise sempre entre P₁ e P'₁. O subsítio S₃ comparado aos subsítios S₁ e S₂, mostrou-se menos específico, pois todos aminoácidos analisados demonstraram eficiência catalítica em diferentes níveis. A maior eficiência foi dependente da presença do aminoácido metionina (resíduo apolar) chegando ao valor de 38236 s⁻¹.mM⁻¹.

Comparando os três subsítios S₁, S₂ e S₃, os maiores valores de eficiência catalítica foram referentes ao S₁, desta forma sugerindo maior influência na hidrólise dos substratos.

Figura 29. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-XLRSSKQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P₃. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

Na figura 30 estão apresentados aos parâmetros cinéticos do subsítio S'₁ da peptidase referente ao aminoácido na posição P'₁ do substrato Abz-KLRXSKQ-EDDnp. Neste subsítio os aminoácidos com maior eficiência catalítica têm duas características principais: isoleucina, leucina e metionina são aminoácidos apolares – 63770, 51367 e 26865 s⁻¹.μM⁻¹ – e tirosina é polar neutro – 44619 s⁻¹.mM⁻¹. Mesmo com estas características, estes resíduos são todos hidrofóbicos, enquanto os resíduos que não apresentaram atividade catalítica são hidrofílicos, o que demonstra que o subsítio S'₁ tem uma especificidade relativa nesta posição. Contudo, os resultados de ponto de clivagem apresentaram uma variação, onde na presença da isoleucina na posição P'₁ a quebra do substrato Abz-KLRISKQ-Eddnp dá-se na proporção 62:38 entre P₁-P'₁ e P'₂-P'₃. Na presença de leucina, o substrato Abz-KLRISKQ-Eddnp é hidrolisado entre as posições P₁-P'₁ e P'₂-P'₃ na proporção 64:36. E por fim, quando a tirosina está na posição P'₁ do substrato Abz-KLRYSKQ-Eddnp, a hidrólise ocorre entre P₁-P'₁ e P'₁-P'₂, na proporção de 77:23. Quanto à afinidade, os aminoácidos hidrofóbicos também demonstraram melhor resultado.

Figura 30. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-KLRXSKQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P₁. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

A figura 31 representa os parâmetros cinéticos do subsítio S'₂ da peptidase referente ao aminoácido na posição P'₂ do substrato Abz-KLR SXKQ-EDDnp. Todos os substratos foram hidrolisados entre P₁ e P'₁. Neste subsítio o aminoácido com maior eficiência catalítica, foi a alanina, um aminoácido apolar alifático. A melhor afinidade foi atingida pela tirosina, estes resultados demonstram que este subsítio não é determinante para eficiência catalítica quando comparado aos demais, pois não possui um perfil de aminoácidos que apresentam melhor afinidade ou maior eficiência catalítica.

Figura 31. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-KLR~~S~~XKQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P'₂. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

Na Figura 32 estão apresentados os parâmetros cinéticos do subsítio S'₃ da peptidase referente ao aminoácido na posição P'₃ do substrato Abz-KLRSSXQ-EDDnp. Os aminoácidos com maior eficiência catalítica e melhor afinidade para este subsítio foram a arginina e alanina, resíduos com características diferentes, ambos com 67207 e 27128 s⁻¹.mM⁻¹ respectivamente. O subsítio S'₃ teve um perfil similar ao S'₂, demonstrando eficiência catalítica para todos os aminoácidos referentes a esta posição, bem como mesmo ponto de clivagem.

Figura 32. Eficiência catalítica da peptidase purificada na hidrólise de substratos peptídicos sintéticos de sequência conhecida (Abz-KLRSSXQ-EDDnp) com substituições nos resíduos de aminoácidos na posição P₃. A reação foi realizada a 50°C utilizando tampão HEPES 50 mM pH 7,0. A eficiência catalítica do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp (P₁R) foi utilizada como controle.

Os valores numéricos dos parâmetros cinéticos referentes aos subsítios S1, S2 e S3 são apresentados na tabela 13 e subsítios S'1, S'2 e S'3 na tabela 14 , ambas nos apêndices.

4. DISCUSSÃO

4.1. Bioprocessos

O fungo *F. oxysporum* é capaz de produzir diversas classes de enzimas, dentre elas as lipases e peptidases. Estudos utilizando diferentes meios de cultura comprovaram esta capacidade, onde este fungo alcançou atividades lipolíticas de 60 U utilizando óleo de oliva e diferentes fontes sintéticas como substrato (DOS PRAZERES; CRUZ; PASTORE, 2006) e cerca de 0,16 U/mg na presença de Tween®20 e elementos traço (HOSHINO et al., 1992). Além da, produção de peptidase de 492 U e 100U/mL quando em presença de gelatina como substrato (ABIDI; LIMAM; NEJIB, 2008; BARATA et al., 2002).

Assim, observamos que é imperativo a determinação da composição do meio de cultura (fontes de carbono e nitrogênio) e condições (temperatura, pH e aeração) do bioprocesso, pois é partir disto que o fungo será ou não induzido a produzir determinada enzima. As fontes de carbono e nitrogênio podem ser classificadas como sintéticas ou naturais, sendo a primeira de custo maior, por isso a necessidade da utilização de *by-products* provenientes de processos agroindustriais, como o farelo de trigo e a farinha de pena.

O farelo de trigo vem sendo extensivamente utilizado na produção de lipase. Desta forma, utilizamos este substrato a fim de aumentar a produção de lipase. Houve uma mudança drástica na produção de lipase quando adicionamos o farelo de trigo, promovendo um aumento em mais de 100 vezes a atividade enzimática. Outros trabalhos relataram atividade de lipase na presença de farelo de trigo como substrato, Ângelo et al (2014) e Fleuri et al. (2014), relataram produções que atingiram 111 U/mL e 13 U/mL de atividade lipolítica utilizando *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus* sp em bioprocesso sólido, respectivamente. Em bioprocesso submerso, Romdhane et al. (2010) e Sekhon et al. (2006), relataram a produção de lipase de 60 U/mL e 1000 U/mL pelos microrganismos *Talaromyces thermophilus* e *Bacillus megaterium*, respectivamente.

A escolha da farinha de pena como substrato para produção de peptidase deu-se pela sua composição proteica predominante. O uso deste composto como substrato aumentou em mais de 10 vezes a atividade proteolítica quando comparado ao meio padrão sem o substrato. Esta diferença indica que a produção de peptidase está

ligada diretamente ao consumo das proteínas presentes na farinha de pena. Uma vez que não há disponibilidade de nutrientes de fácil absorção, o microrganismo passa a produzir enzimas com intuito de hidrolisar substratos mais complexos presentes no meio, a fim de obter fonte nutritiva para o crescimento e metabolismo (ALLISON; VITOUSEK, 2005; KOCH, 1985). Diversos trabalhos apontaram a farinha de pena como um substrato viável para produção de peptidase, Thys et al. (2006) relataram uma produção de 270 U/mL pela bactéria *Microbacterium* sp e More et al. (2013) relataram um pico de produção de 118 U/mL pelo fungo *Cunninghamella echinulata*.

4.2.Purificação das hidrolases nativas

Ambas enzimas foram purificadas a partir de métodos convencionais. Habitualmente, a purificação de lipase requer mais de um passo cromatográfico (TAN et al., 2015). Apesar disto, o protocolo determinado neste trabalho possui somente uma etapa de purificação, o que facilita e diminui custos na obtenção da lipase pura. O índice de purificação foi menor que o índice do extrato bruto, isto deve-se provavelmente a presença de diferentes tipos de lipases, como demonstrados no zimograma do extrato bruto. De acordo com Tan et al (2004) a lipase produzida por *Penicillium camembertii* Thom PG-3 foi purificada após três etapas de precipitação seguida de uma etapa cromatográfica gerando um índice de purificação de 22,1 e rendimento de 8,7%. Em contrapartida, Liu et al. (2009) a purificou uma lipase proveniente do fungo *Fusarium solani* N4-2, através de fracionamento com acetona seguida de uma etapa cromatográfica utilizando resina aniônica Q-sepharose®, resultando em um fator de purificação e rendimento de 34 e 42%, respectivamente.

A fim de diminuir os contaminantes bem como concentrar a amostra, o extrato bruto com atividade proteolítica foi submetido à precipitação com sulfato de amônio, proporcionando um efeito de *salting out*. Cada proteína possui características intrínsecas de solubilidade, facilitando o início do processo de separação das proteínas (DUONG-LY; GABELLI, 2014). Os métodos de purificação são peculiares a cada proteína alvo, os processos realizados neste trabalho evidenciaram uma menor perda de atividade enzimática, dado que o rendimento final foi maior que 78%. Outros trabalhos comprovaram menores rendimentos, tais como, Abidi et al.

(2011) purificaram uma peptidase de *Botrytis cinerea* proveniente de bioprocesso submerso com quatro etapas diferentes, chegando a um rendimento final de 5,6% e purificação de 19 vezes. Em contrapartida, Barata et al. (2002) demonstraram uma purificação de peptidase de *F. oxysporum*, cujo rendimento foi de 2,6% e purificação de 65 vezes.

4.3.Caracterização bioquímica das hidrolases nativas

4.3.1. Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O pH ótimo é uma característica imprescindível para atividade enzimática, uma vez que é responsável por manter ionizáveis os grupos importantes para atividade catalítica. A lipase demonstrou-se alcalina, enquanto a peptidase tem característica neutra. As atividades diminuíram em pH extremos provavelmente devido à influência dos pH ácido e básico nos aminoácidos, promovendo modificação estrutural prejudicando a atividade catalítica (COPELAND, 2000).

O efeito de pH na estabilidade da lipase demonstrou que a enzima é instável na maioria dos pH com exceção do pH 7,5, este perfil deve-se provavelmente à influência dos diferentes sais dos tampões ao substrato ou à própria lipase. Diferentemente da peptidase que apresentou estabilidade ampla. Como apresentado na tabela 8, lipases produzidas por espécies do gênero *Fusarium* sp e *Fusarium oxysporum* demonstraram pH ótimo neutro ou alcalino, este último com pH ótimo de 8,0 e 9,0. A estabilidade em pH destas enzimas atende diferentes perfis, de neutros (6,0-7,0), alcalinos (8,0-10,0) ou ainda de ácidos a alcalinos (5,0-9,0).

A temperatura é um fator que afeta diretamente a atividade e estabilidade enzimática, uma vez que é responsável pelo aumento de energia cinética do sistema consequentemente aumenta a colisão entre substrato/enzima e a atividade enzimática. Contudo, quando há um aumento exacerbado da temperatura há a quebra de interações essenciais para estrutura da enzima, provocando sua desnaturação. A lipase obtida neste trabalho possui um perfil de temperatura ótima e estabilidade próximo à lipase produzida por *Fusarium solani* (LIU et al., 2009), enquanto a peptidase se assemelha ao perfil obtido por Ueda et al. (2007) e Chandrasekaran e Sathiyabama (2014) apresentado na tabela 8.

A tabela 8 resume estudos que caracterizaram diversas lipases e peptidases produzidas por bioprocessos submersos e purificadas utilizando metodologias distintas. Isto demonstra o quão versáteis os microrganismos podem ser, quando submetidos a condições específicas de crescimento.

Tabela 8. Comparação de características bioquímicas de lipases e peptidases purificadas obtidas em diversos estudos com diferentes microrganismos.

Enzima	pH otm*	pH est**	T°C otm*	T°C est**	Fungo	Referência
Lipase	10,0	7,0-7,5	35°C	25-45°C	<i>Fusarium oxysporum</i>	Este trabalho
	7,0	6,0-7,0	42°C	60°C	<i>Fusarium oxysporum</i>	Hoshino et al., 1992
	7,0	5,0-9,0	37°C	-	<i>Fusarium sp.</i>	Mase et al., 1995
	8,0	7,0-9,0	50°C	30-60°C	<i>Fusarium oxysporum</i>	Dos Prazeres, 2006
	8,0	7,0-10,0	45°C	25-60°C	<i>Antrodia cinnamomea</i>	Shu et al., 2006
	8,0	4,0-10,0	40°C	25-35°C	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Yu et al., 2007
	9,0	8,0-11,0	30°C	30-50°C	<i>Fusarium solani</i>	Liu et al., 2009
	9,5	9,0-11,0	50°C	>55°C	<i>Talaromyces thermophilus</i>	Romdhane et al., 2010
	12,0	5,0-12,5	60°C	30-60°C	<i>Staphylococcus sp.</i>	Cherif et al., 2011
	8,0	8,0-10,0	30°C	30-40°C	<i>Fusarium oxysporum</i>	Panuthai et al., 2012
Peptidase	8,5	7,5-10,5	65°C	50-80°C	<i>Burkholderia ubonensis</i>	Yang et al., 2016
	7,0	3,0-10,0	50°C	30-60°C	<i>Fusarium oxysporum</i>	Este trabalho
	9,0	4,1-7,7	45°C	24-50°C	<i>Fusarium culmorum</i>	Pekkarinen et al., 2002
	9,0	3,0-10,0	50°C	10-60°C	<i>Fusarium sp.</i>	Ueda et al., 2007
	8,0	5,0-11,0	35°C	20-60°C	<i>Aspergillus nidulans</i>	Charles et al., 2008
	8,5	6,0-9,0	45°C	<37°C	<i>Fusarium sp.</i>	Wu et al., 2009
	7,0	6,0-10,0	50°C	-	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Wang et al., 2013
	10,0	6,0-11,0	50°C	10-60°C	<i>Alternaria solani</i>	Chandrasekaran, 2014
	10,0	Instável	60°C	30-35°C	<i>Fusarium equiseti</i>	Juntunen et al., 2015
	11,0	8,0-12,0	50°C	50-70°C	<i>Aspergillus terreus</i>	Niyonzima et al., 2015

*otm: ótimo;

**est: estabilidade – acima de 50% após 1 hora de exposição.

4.3.2. Efeito de inibidores na atividade proteolítica

O ensaio de inibidores foi realizado somente para peptidases, onde foi determinada a presença de uma serino peptidase. A fim de determinar especificamente a classe da peptidase utilizamos inibidores diferenciais que evidenciaram uma queda na atividade em diferentes níveis tornando inconclusiva a determinação se a serino peptidase é uma tripsina, quimiotripsina ou subtilisina. Diversos estudos encontraram serino peptidases das classes subtilisina (DI PIETRO et al., 2001), tripsina (RYPNIEWSKI et al., 2001) e quimiotripsina (WU et al., 2009). Estas enzimas foram relatadas por Karimi Jashni et al. (2015) como serino

peptidases produzidas por *Fusarium oxysporum* responsáveis pela patogenicidade, degradando quitinases (fator de resistência da planta a infecção por fungos) ou fazendo parte de um complexo enzimático capaz de invadir a plantas infectadas.

4.3.3. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática

Os íons metálicos podem ser determinantes na organização estrutural da proteína, e desta forma influenciar na atividade e estabilidade da mesma (MERHEB-DINI et al., 2009). Estes íons podem servir como doador/receptor de elétrons, ácidos de Lewis ou reguladores estruturais. As enzimas afetadas por estes íons são definidas como metaloenzimas ou complexos metal-enzima. A primeira, contém uma ligação forte com o íon, sendo uma parte integral da proteína. Em contrapartida, o complexo metal-enzima possui interações mais fracas, o íon não é, frequentemente, uma parte integral da proteína. Em uma reação enzimática o íon pode agir de três formas principais: na interação direta com o substrato antes ou depois que este se liga a enzima, modificando a atividade enzimática; o metal pode se ligar à enzima antes desta se ligar ao substrato e servir como um sítio de ligação ou facilitar a atividade catalítica; e ainda o íon pode se ligar a um local distante do sítio catalítico, atuando na manutenção da estrutura da enzima bem como de sua estabilidade (RIORDAN, 1977).

A influência dos íons depende de diversos fatores que incluem as características do íon (estado de valência, raio iônico, entre outras), características dos ligantes (carga, momento dipolo e polarizabilidade), propriedades da ligação íon-ligante (número de coordenação e a geometria gerada), efeito dos ligantes em segundo plano e o efeito da matriz proteica e solvente (DUDEV; LIM, 2014). Portanto, a relação entre íons e determinada proteína seguem um perfil seletivo, podendo ser influenciada negativa ou positivamente.

O ensaio realizado com a lipase demonstrou que a enzima é lábil a diferentes íons com exceção do íon monovalente Na^+ . Como relatado por Page e Di Cera (2006), enzimas que necessitam de Na^+ como as β -galactosidase e peptidases (coagulação) não são ativadas por Li^+ ou cátion monovalente com raio iônico maior como o K^+ . Devido a flexibilidade das proteínas, a seleção/ligação do metal à proteína é imperfeita. A ligação de um metal não ideal pode explorar um subconjunto de ligantes e/ou distorcer a geometria de ligação nativa. Tipicamente, uma proteína

torna-se inativa, se um ou mais resíduos de um local de metal ativo são recrutados para um local alternativo, talvez com uma geometria alternativa, por um metal mais competitivo (FOSTER; OSMAN; ROBINSON, 2014).

Diferentes perfis foram encontrados na literatura, Yang et al. (2016) demonstraram a presença de uma lipase cuja atividade foi modulada negativamente pelo íon Al^{3+} (1 mM) e positivamente por íons divalentes. Borkar et al. (2009) descreveram o efeito positivo na atividade de lipase na presença de Ca^{2+} (1 mM), enquanto o Na^+ manteve a mesma atividade do controle, porém Zn^{2+} e Cu^{2+} tiveram uma influência negativa com perda de cerca 70% de atividade. Uma lipase produzida por *Fusarium solani* foi inibida por Zn^{2+} e Ba^{2+} , enquanto os íons K^+ e Na^+ não afetaram a atividade, e os íons Cu^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} aumentaram em até 15% a atividade e Al^{3+} aumentou em 189%. A Lipolase (lipase comercial) foi inibida por Ba^{2+} e Cu^{2+} , os íons Ca^{2+} , K^+ , Na^+ e Al^{3+} , não afetaram a atividade e os íons Zn^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+} aumentaram até 9% a atividade (LIU et al., 2009).

A peptidase apresentou um perfil distinto da lipase, onde houve aumento da atividade enzimática na presença de íons divalentes (Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} e Ni^{2+}), os íons monovalentes (Na^+ , K^+ e Li^+), o Zn^{2+} e o Al^{3+} não afetaram a atividade e somente os íons cobalto e cobre tiveram influência negativa na atividade catalítica.

De acordo com Coolbear et al (1992), os íons Cu^{2+} e Co^{2+} , ambos metais de transição, possuem raios de 0,74 e 0,73 Å, respectivamente. O íon Cu^{2+} tende a formar complexos tetraédricos e o íon Co^{2+} pode formar complexos tetraédricos ou octaédricos. Desta forma podemos observar que a modulação negativa na atividade pode ser devido às características similares destes íons.

De acordo com diversos autores, vários íons divalentes promoveram uma modulação positiva quando comparada ao seu respectivo controle. Barata et al (2002) relataram a influência de Mg^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} (1mM) na atividade enzimática da serino peptidase (tripsina-like) produzida por *F. oxysporum*, com aumento em 27, 29 e 7%, respectivamente. Enquanto, a peptidase produzida por *A. terreus* teve sua atividade aumentada na presença dos íons Ca^{2+} e Mg^{2+} e diminuída quando incubada com Hg^{2+} (NIYONZIMA; MORE, 2015). E a peptidase produzida por *Penicillium waksmanii* foi modulada positivamente pelos íons Ca^{2+} , Ba^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , e negativamente por Mn^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+} e Li^+ (GRAMINHO et al., 2013).

4.3.4. Efeito de surfactantes na atividade enzimática

Os surfactantes (detergentes) são moléculas que podem influenciar a atividade enzimática em duas formas: diretamente, ao ligar-se à enzima, influenciando na estrutura ou flexibilidade da estrutura, e indiretamente, mas ao mesmo tempo importante, na qual os surfactantes modificam o microambiente na qual a enzima está inserida (RUBINGH, 1996). As interações do surfactante à proteína ou ao microambiente podem ocorrer quando o composto está na forma monomérica ou em micelas. Os detergentes são anfifílicos, ou seja, possuem uma porção polar e outra hidrofóbica, e a depender de sua concentração (concentração crítica micelar - CMC) formam estruturas micelares, cuja interação com a proteína bem como com substrato são diferentes da monomérica. A CMC para cada surfactante é única e variam com a força iônica do ambiente reacional, principalmente aqueles classificados como iônicos (OTZEN, 2011).

O efeito destes compostos foi avaliado no intuito de determinar a inibição, ativação ou a não influência na atividade enzimática, uma vez que são determinantes para possíveis aplicações. Os surfactantes utilizados são pertencentes a duas classes diferentes, os iônicos (SDS – aniônico e CTAB - catiônico) conhecidos agentes desnaturantes, e os não iônicos (Tween 80® e Triton X-100), menos agressivos à estrutura proteica. A lipase e a peptidase obtiveram perfis distintos na presença destes surfactantes.

De forma geral o detergente SDS promoveu desnaturação de ambas enzimas, sendo a lipase mais sensível, uma vez que a queda abrupta na atividade enzimática ocorreu nas menores concentrações. Este é um surfactante conhecido por desnaturar proteínas causando a quebra de ligações não covalentes e consequentemente a perda de sua conformação nativa. A capacidade de ligação deste detergente às proteínas é alta, facilitando o processo de perda da atividade catalítica (BOZORGMEHR; HOUSAINDOKHT, 2010). Estudos demonstraram a inibição de lipases produzidas por *Pseudomonas aeruginosa* em 70%, *Fusarium solani* em 55%, *Burkholderia ubonensis* em 95% e Lipolase® em 73%, todas na concentração de 1,0% de SDS (BORKAR et al., 2009; LIU et al., 2009; YANG et al., 2016). Enquanto a peptidase obtida a partir do microrganismo *Aspergillus terreus* foi ativada quando em contato com 1% e 5% de SDS atingindo cerca de 250% e 200% de atividade enzimática (NIYONZIMA; MORE, 2015). Em contrapartida, o efeito

inibitório também foi relatado por Graminho et al (2013) e Zanthorlin et al (2011), cujas peptidases produzidas por *Penicillium waksmanii* e *Myceliophthora* sp., respectivamente, foram inibidas completamente por 0,1% de SDS.

O detergente CTAB (catiônico), também promoveu a inibição da atividade lipolítica. Um perfil similar foi apresentado por Salameh e Wiegel (2010), onde duas lipases produzidas por *Thermosyntropha lipolytica*, foram inibidas por CTAB, este comportamento pode ser atribuído às interações eletrostáticas desfavoráveis que podem causar a perda do *fold* da proteína bem como o rompimento da ligação com o substrato (OTZEN, 2002). Em contrapartida, a atividade proteolítica não foi afetada em nenhuma concentração apresentada. Por ser catiônico, este detergente segue mecanismo similar ao relatado para o SDS, a diferença entre eles é a interação em regiões distintas da proteína. Esta interação foi relatada por Nozaki et al (1974) como sendo de menor afinidade devido a cadeia lateral envolvida, portanto o perfil contrário na atividade proteolítica pode ser devido a esta diferença de interações. Guzman et al (2016) também demonstra que a atividade da pepsina não é influenciada em concentrações distintas do detergente, bem como, Thebti et al (2016) constata que a peptidase produzida por *Geobacillus toebii* não é influenciada a 1% de CTAB.

Os detergentes não iônicos ou neutros podem afetar a atividade enzimática caso esteja em concentrações acima da CMC, a forma monomérica age em conjunto com a forma micelar a fim de promover a desnaturação da proteína (OTZEN; SEHGAL; WESTH, 2009). Ambos detergentes, Tween® 80 e Triton X-100, foram utilizados na concentração micelar crítica ou acima dela – 0,005% e 0,01%, respectivamente - portanto a perda de atividade apresentada é justificada pela presença das micelas. Liu et al. (2009) apresenta a inibição da Lipolase® em 31 e 48%, em concentração de detergente acima da CMC. Da mesma forma, podemos observar que a interação da peptidase produzida neste trabalho é dependente da CMC do surfactante Tween® 80, uma vez que o decréscimo da atividade é inversamente proporcional à concentração do surfactante. Já o efeito do detergente Triton X-100 demonstrou-se independente da CMC, uma vez que houve um nível constante de inibição. Diferentes peptidases demonstraram perfis distintos na presença destes detergentes não iônicos, a peptidase produzida por *Myceliophthora* sp. foi inibida em 13% e 80% pelo Tween®80 e Triton X-100, respectivamente (ZANTHORLIN et al., 2011). Já a

peptidase produzida por *Aspergillus terreus* foi ativada por ambos (NIYONZIMA; MORE, 2015).

4.3.5. Efeito de agentes caotrópicos e DTT na atividade enzimática

DTT é um agente capaz de reduzir ligações de dissulfeto responsáveis pela estabilização da estrutura terciária da proteína, promovida pela presença do aminoácido cisteína (KUWAJIMA et al., 1990). A lipase produzida neste trabalho foi completamente desnaturada pela presença do DTT, diversos estudos apresentaram cisteínas nas sequências de lipases, cujo papel é crucial na formação de pontes ou ligações de dissulfeto, consequentemente essencial para a manutenção estrutural e consequentemente para a atividade catalítica. Brady et al (1990) relatou a presença de pelo menos três pontes de dissulfeto essenciais para a estrutura global e terminal de uma lipase produzida por *Rhizomucor miehei*, enquanto Fickers et al (2005) apresentaram uma lipase de *Yarrowia lipolytica* com quatro pontes importantes para o *folding* da proteína. Em relação a atividade catalítica, estudos demonstraram uma inibição de 70% e 100% de lipases produzidas por *Burkholderia ubonensis* e *Bacillus* sp., respectivamente (SHARIFF et al., 2011; YANG et al., 2016). Já a peptidase sofreu baixa inibição deste agente redutor, Singh e Whitesides (1995) relata que em pH 7,0-8,0, o DTT tem uma pequena fração (~1%) reativa, portanto seu efeito é mais lento. E caso a proteína não possuir muitos resíduos de cisteína capazes de promover a formação de pontes de dissulfeto, o efeito do DTT será menor. Graminho et al (2013) analisaram a influência do DTT na atividade enzimática de uma peptidase produzida por *Penicillium waksmanii* em concentrações de 1 a 100 mM, onde não foi apontada nenhuma diferença quando comparada ao controle, enquanto em Zanhorlin et al (2011) houve uma perda de atividade enzimática em 20% a atividade inicial da peptidase produzida por *Myceliophthora* sp.

Diferente do agente redutor mencionado anteriormente, os agentes caotrópicos, ureia e cloridrato de guanidina, são compostos conhecidos por perturbar a estrutura da proteína através do rompimento das pontes de hidrogênio criadas entre as moléculas de água e aminoácidos, bem como pela capacidade de ligação em sítios hidrofóbicos ou polares na própria estrutura proteica (SALVI; DE LOS RIOS; VENDRUSCOLO, 2005). Estes mecanismos podem levar à desnaturação da

proteína, bem como a possíveis alterações na estrutura favorecendo a atividade catalítica.

A ureia não afetou a atividade lipolítica da mesma forma que o cloridrato de guanidina, isto pode ser explicado pela diferença de cargas entre os dois agentes, uma vez que a guanidina é um forte agente caotrópico catiônico, enquanto a ureia é um agente não carregado (DA SILVA et al., 2016). Esta característica pode somar ao efeito da guanidina causando a desnaturação progressiva da proteína. Além disso, o aumento da atividade lipolítica na concentração de 100 mM de ureia pode ser justificado pelo aumento da flexibilidade da estrutura, favorecendo a atividade catalítica (THIAN et al., 2015).

A peptidase demonstrou-se resistente à influência dos agentes caotrópicos em diferentes concentrações. Da Silva et al (2016) relata o efeito destes agentes caotrópicos na atividade enzimática da peptidase produzida por *Rhizomucor miehei*, onde a ureia não apresentou nenhuma interferência na atividade enquanto o hidrocloreto de guanidina inibiu a atividade em pelo menos 30% na presença de 100 mM do composto.

4.3.6. Estudo de especificidade e sequenciamento– peptidase

A especificidade de uma enzima frente a um substrato é determinada pela sua capacidade de formar um complexo estável com um ligante. Restrições estéricas, forças intermoleculares e os efeitos hidrofóbicos contribuem para esta estabilidade (EVNIN; VASQUEZ; CRAIK, 1990). A eficiência catalítica apresenta essa preferência da peptidase por cada aminoácido em seu respectivo subsítio.

Diversos estudos demonstraram a especificidade de serino peptidases com a mesma estrutura de substrato utilizada em nosso trabalho, porém com resultados diferentes. De acordo com Da Silva et al (2014), a serino peptidase produzida por *Aspergillus fumigatus* Frenesius demonstrou uma preferência por aminoácidos apolares nas posições próximas a região N-terminal (não-linha) e as posições P'₁ e P'₂ da região C-terminal, porém foi o subsítio S'₃ que apresentou a maior eficiência catalítica quando o aminoácido leucina encontrava-se na posição P'₃ no substrato Abz-KLRSSLQ-EDDnp. Diferentemente, a serino peptidase produzida por *Myceliophthora thermophila* apresentou uma preferência por treonina, valina e ácido glutâmico nas posições não linha, e na porção linha a preferência por alanina nos

dois primeiros subsítios e metionina no subsítio S₃, porém a maior eficiência apresentada foi para o subsítio S₂ (NETO et al., 2015). O fungo *Penicillium waksmanii* produziu uma serino peptidase com perfil de eficiência catalítica, onde nas posições P₃ (metionina) e P'₂ (alanina) demonstraram a mesma preferência que a peptidase purificada neste trabalho, porém os demais subsítios apresentaram preferências diferentes (GRAMINHO et al., 2013).

Existem serino peptidases com especificidade determinada para um subsítio específico, como no caso das quimiotripsinas, cuja preferência em seu sítio S₁ é conferida por substratos onde há a presença de triptofano, tirosina ou fenilalanina na posição P₁. Em contrapartida, a tripsina apresenta preferência pelos aminoácidos carregados positivamente, lisina ou arginina, na posição P₁, além disso existe uma influência negativa na hidrólise quando a prolina se encontra na posição P'₁ e resíduos ácidos e básicos na mesma posição P'₁ e na posição P'₂ (KEIL, 1992). A serino peptidase apresentada neste trabalho demonstrou características próximas à tripsina, onde a maior eficiência catalítica foi apresentada quando a lisina estava na posição P₁. Quando a prolina e os resíduos ácidos estavam nas posições P'₁ não houve hidrólise, já quando os ácidos glutâmico e aspártico se encontravam na posição P'₂ houve baixa hidrólise quando comparada aos demais.

Contudo, é importante entender que a especificidade de uma peptidase não só depende de um subsítio isolado e sua interação, mas também dependente da cooperação entre seus subsítios. A ligação de um resíduo de aminoácido particular a um subsítio pode influenciar positivamente ou negativamente a ligação de resíduos a outros subsítios, e refere-se a alterações na afinidade do substrato causadas pela ligação do substrato ao sítio ativo da peptidase (NG; PIKE; BOYD, 2009).

Os resultados obtidos para todos subsítios apresentaram hidrólise da maioria dos substratos, isto mostra que apesar de preferir alguns aminoácidos em posições específicas, a peptidase é capaz de hidrolisar uma série de substratos com composições diferentes, tornando-a inespecífica. Também é possível inferir que os subsítios S₁, S₂ e S'₁ tem maior influência na atividade proteolítica.

5. CONCLUSÃO

O nosso trabalho demonstrou a capacidade do fungo *Fusarium oxysporum* em produzir as hidrolases das subclasses peptidase e lipase, em bioprocesso submerso com meio de cultura composto por resíduo agroindustrial insolúvel.

Devido à composição rica de um destes resíduos, o farelo de trigo, o fungo foi capaz de produzir pelo menos quatro tipos diferentes de lipases. O processo de purificação desenvolvido foi simples, eficiente, e adequado ao gerar uma das lipases puras para caracterização. A lipase purificada foi caracterizada como alcalina e com preferência a temperaturas mais amenas, além de ser lábil a diversas condições de pH, temperatura e presença de íons, surfactantes e agentes caotrópicos/sulfidrílico. Estas características são interessantes, porém são necessários processos que possam proteger esta enzima do efeito de compostos externos como a encapsulação ou imobilização de diferentes formas, a fim de buscar aplicações biotecnológicas.

A peptidase produzida pela indução com farinha de pena possui características convenientes a muitas aplicações. Apesar de neutra possui atividade considerável em pH ácido e básico, além de suportar diversas temperaturas e ser estável a diversas condições e presença de vários compostos. Quanto a especificidade, pudemos observar que é uma enzima inespecífica e capaz de hidrolisar diversos substratos. Estas características possibilitam inferir que esta enzima é um metabólito primário com função no metabolismo proteico para obtenção de nutrientes para o crescimento do fungo. Além disso, pode ser interessante a inúmeras aplicações biotecnológicas, desde biorremediação a aplicação em detergentes.

Capítulo 2

1. INTRODUÇÃO

A inovação na pesquisa é algo necessário para o desenvolvimento, bem como para a descoberta de novos propósitos para técnicas ou processos existentes. A utilização de metodologias da engenharia de proteína, como a produção de enzimas híbridas, as técnicas de DNA recombinante e a expressão heteróloga, data de muitos anos. A criação de enzimas bifuncionais é uma evolução destas técnicas a fim de inovar e facilitar novos e processos antigos pela catálise de diversos substratos simultaneamente (YOURNO; KOHNO, 1970).

Contudo, o estudo da hibridização de duas hidrolases das subclasses peptidase e lipase (grande responsáveis pelo aumento da importância das enzimas no mercado mundial) não havia sido determinado. Para tanto, utilizamos as informações disponíveis na literatura e base de dados, sobre peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*, a fim de produzir uma enzima bifuncional capaz de hidrolisar substratos lipídicos e proteicos, visando aplicação biotecnológica conjunta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Determinação da composição da enzima bifuncional – peptidase e lipase

A fim de obter uma enzima bifuncional (quimera), buscamos na literatura e nas mais diversas bases de dados de sequências de proteínas e material genético, UniProt, NCBI, PDB, entre outras, duas enzimas das subclasses peptidase e lipase, ambas provenientes do fungo *Fusarium oxysporum*.

A peptidase foi baseada no estudo de Di Pietro et al (2001), cujo relato apresenta uma serino peptidase subtilisina-like produzida por *F. oxysporum*, uma das subclasses mais populares em aplicações biotecnológicas.

Devido a divergência na classificação de lipases, a forma escolhida para determinação da lipase para quimera deu-se a partir da similaridade de sua sequência com a lipase já conhecida e produzida por *Thermomyces lanuginosus*. A sequência foi analisada e comparada ao banco de dados de proteínas de *F. oxysporum* pela ferramenta BLAST do banco de dados Uniprot.

Uma vez selecionadas, as enzimas foram submetidas a um estudo estrutural preliminar em colaboração com Professor Dr. Richard Ward, FCFLRP-USP. Ambas proteínas não possuíam estrutura determinada, portanto consideramos o modelo estrutural da lipase de *T. lanuginosus* e a peptidase consideramos o modelo gerado pelo banco de dados PSI-KB (*Protein Structure Initiative Knowledgebase*).

A formação da enzima bifuncional deu-se pela utilização de um *linker* composto por cinco aminoácidos (GGAGG), cujo sítio de ligação localizou-se entre a região C-terminal da peptidase e a região N-terminal da lipase. Isto deve-se à possível presença da *lid* (estrutura importante para atividade catalítica – item 1.1.1), próxima à porção C-terminal da lipase. Uma vez determinada as sequências e localização de cada enzima e *linker*, foi realizada uma análise para determinação do sítio de clivagem do peptídeo sinal, bem como a presença de N-glicosilações utilizando as ferramentas online SignalIP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalIP/>) e NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), respectivamente.

2.2. Expressão heteróloga – pPICZ α A e *Pichia pastoris*

Dado os resultados, optamos pela utilização da levedura metilotrófica, *Pichia pastoris*, como sistema de expressão devido as suas vantagens no processamento de proteínas, bem como sua capacidade de promover glicosilações e de secretar proteínas em alto rendimento. Mais especificamente, a cepa KM71H, já que esta é tipo Mut^s, de crescimento lento, utilizando menos metanol para expressão da proteína desejada.

O gene foi sintetizado pela empresa GenScript® e foi adquirido já em vetor de expressão pPicZ α -A (Invitrogen®), escolhido pela presença do gene *Sh ble* cuja função é de conferir a resistência à Zeocina® - antibiótico da família bleomicina – em ambos microrganismos *E.coli* e *P. pastoris*. Além de conter um sítio múltiplo de clonagem, constituído de diversos sítios de restrições únicos a cada proteína a ser expressa, e a presença de um promotor AOX1, que não compete com o mesmo gene da levedura (uma vez que foi silenciado), promovendo maior expressão da proteína com menor uso de metanol (CREGG, 1993).

Podemos observar no mapa e sequência do vetor de expressão (Figura 33 e 34) que a estratégia escolhida para inserção da sequência foi na região entre as enzimas de restrição XhoI e Sall com a reconstrução do sítio de clivagem Kex2 e inserção da cauda de histidina no início da sequência e um *stop códon* ao final, evitando a cauda de histidina do vetor.

Figura 33. Mapa do vetor de expressão pPICZ α A.

FONTE: Invitrogen® Life Technologies Corporation, 2010.

Figura 34. Sequência do vetor de expressão pPICZα A.

FONTE: Invitrogen® Life Technologies Corporation, 2010.

2.2.1. Linearização – pPICZαA-Quimera

Uma vez que o gene foi sintetizado já em seu vetor de expressão, a etapa seguinte para a produção da quimera foi a linearização do pPICZαA_Quimera utilizando a enzima PmeI (*New England Biolabs*), segundo as orientações do fabricante. Esta etapa foi observada através da utilização do sistema *E-gel precast agarose electrophoresis system* (*Thermo Fischer Scientific*), que consiste em um gel de agarose 2% em um cassete, onde é possível observar a corrida em tempo real.

2.2.2. Transformação em *Pichia pastoris*

A produção de células competentes para posterior transformação por eletroporação deu-se a partir de um estoque da cepa de *P. pastoris* KM71H conservada em glicerol 30%, foi realizado um pré-inóculo em tubos plásticos de centrifuga de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultura YEPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%) e a cepa KM71H, incubados em shaker orbital a 30 °C por 8 horas a 220 rpm. Deste pré-inóculo foram retirados 50 µL e adicionados a 50mL de YEPD em frasco erlenmeyer de 250 mL, incubados a 30°C/220 rpm overnight. Após o tempo de crescimento, foi medido a D.O._{600nm} (densidade óptica em 600nm) que deve estar entre 1,0 e 1,5 e manter o frasco em gelo por 10 minutos. O volume total obtido foi centrifugado a 1500 x g por 5 minutos a 4 °C, então as células foram recuperadas e mantidas em gelo. Rapidamente, foram ressuspensas em 10 mL de YEPD e 2 mL de tampão HEPES 1M pH 7,0, adicionados de 250 µL de DTT 1M, homogeneizados e por fim incubados a 30 °C por 15 minutos. Foram então feitas lavagens com água gelada por duas vezes, e após a última centrifugação, as células foram ressuspensas em 2 mL de sorbitol 1M gelado, centrifugadas e o sobrenadante foi eliminado. Como etapa final, 100 µL de sorbitol 1M foram adicionados às células competentes e aliquotadas em volumes de 40 µL por microtubo.

Para dar seguimento à transformação, adicionamos 1 µg de pPICZαA-Quimera linearizado às células e homogeneizamos. Posteriormente, o volume foi transferido para cubetas GenePulser® 0,2 cm (BioRad) e submetidas à eletroporação a 1,5 KV – 25 µF – 200 Ω, foram então incubadas em gelo por 5 minutos. Adicionamos 500 µL de sorbitol 1 M e 500 µL de YEPD e incubamos a 30 °C por 2 horas. Finalmente, após o tempo de incubação as células com o inserto foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura YPDS (YEPD e Sorbitol 1 M) adicionadas de Zeocina® nas concentrações 100 µg/mL e 500 µg/mL, as placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas.

2.2.3. Screening da expressão

A fim de determinar a colônia que melhor expressou a quimera, foram escolhidas colônias isoladas das placas com antibiótico. Cada isolado foi incubado em tubo

plástico de 50 mL contendo 5 mL de meio de cultura BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 6,0 e glicerol 1%), a 30 °C e 220 rpm por 48 horas até atingir D.O._{600nm} entre 2 e 6. Além dos isolados, dois controles foram feitos, o primeiro sem levedura a fim de determinar se a técnica foi realizada sem contaminações e o segundo com a cepa KM71H sem o gene da quimera.

Após atingir a D.O._{600nm} indicada, o meio foi trocado para 3 mL de meio de cultura BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, YNB 1,34%, biotina $4 \times 10^{-5}\%$, tampão fosfato de potássio 100mM pH 6,0 e Metanol 0,5%), incubado a 30 °C/220 rpm. A cada 24 horas, foi adicionado metanol absoluto na concentração final de 0,75% e retiradas alíquotas para avaliação da expressão. A avaliação da expressão deu-se por SDS-PAGE e atividade lipolítica *in situ*, através de zimograma (item 2.2.4.1), cujo substrato utilizado foi o MU-Bu (item 2.2.4.1) (LAEMMLI, 1970; SEE E JACKOWSKY, 1989; PRIM et al, 2003).

2.2.4. Expressão em larga escala e purificação da Quimera (QuimLP)

O clone que apresentou melhor expressão foi selecionado para o escalonamento e purificação da QuimLP. O pré-inóculo foi realizado em 10 mL de BMGY, a partir da colônia isolada da placa ou da cepa estoque com o inserto, incubado a 30°C, 220 rpm durante 24 horas. A massa celular foi então inoculada em frasco erlenmeyer (2 L) contendo 500 mL de BMGY e mantido a 30°C, 220 rpm durante 24 horas. O volume total foi centrifugado por 5 minutos a 1500 $\times g$ e ressuspensão em frasco erlenmeyer haletado (1 L) preenchido com 100 mL de meio BMMY para indução com metanol. Após 72 horas de incubação o extrato com a quimera em solução foi recuperado e submetido a purificação por cromatografia de afinidade.

O protocolo de purificação foi realizado utilizando uma coluna Tricorn 5/50 preenchida com resina Ni Sepharose™ excel acoplado ao sistema *Akta Purifier* UPC 900. A resina foi equilibrada com tampão composto por Tris 10 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e NaCl 100 mM, o volume aplicado de 2 mL de extrato bruto foi então lavado com 30 mL de tampão de equilíbrio, que foi seguido por um gradiente linear de imidazol (responsável pelo desligamento da proteína com cauda de histidina) presente no tampão de eluição, cuja composição é a mesma do tampão de equilíbrio adicionado de 250 mM de imidazol.

As frações coletadas, referentes ao pico da quimera, foram submetidas a ensaios de atividade lipolítica e proteolítica *in situ*, através de zimogramas cujos substratos utilizados foram o MU-Bu e gelatina, respectivamente.

2.2.4.1. Zimograma – Lipase

SDS-PAGE foi realizado como descrito por Laemmli et al (1989) na porcentagem de 12%. O preparo da amostra deu-se com tampão sem DTT e sem a etapa de fervura, para evitar a desnaturação da enzima. Após a corrida, o gel foi imerso em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0 adicionado de 2,5% Triton X-100® por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavagem rápida com tampão sem o surfactante. Então, o Gel foi mergulhado em MU-Bu 100mM no mesmo tampão. A banda com atividade lipolítica tornou-se detectável (Fotodocumentador Gel Doc™ EZ System) entre 5 e 10 minutos. Subsequentemente, os géis foram submetidos a coloração com Coomassie Brilliant Blue R®-250 (PRIM et al, 2003).

2.2.4.2. Zimograma – Peptidase

Os géis para determinação de atividade proteolítica também foram feitos segundo Laemmli et al (1989) na porcentagem de 12%, porém incorporados à malha do gel 0,1% de gelatina. O preparo da amostra deu-se com tampão sem DTT e sem a etapa de fervura, para evitar a desnaturação da enzima. Após a corrida, o gel foi imergido em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5 adicionado de 2,5% Triton X-100® por 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavagem rápida com água destilada e uma segunda etapa com a mesma solução com Triton X-100®. Após a remoção de SDS pela solução com Triton X-100®, o gel foi imerso em tampão fosfato de sódio 50mM pH 6,5, a 45°C, overnight. Subsequentemente, os géis foram submetidos a coloração com Coomassie Brilliant Blue R®-250, onde o gel é completamente corado deixando as bandas onde a gelatina foi consumida, transparentes (MAROKHÁZI, 2004, modificado).

2.2.5. Clonagem das enzimas lipase e peptidase heterólogas separadas

Primeiramente, foi necessário expandir o gene sintético através da transformação em bactéria *Escherichia coli* DH10 β e posterior cultivo destas bactérias transformadas, a fim de obter material suficiente para separação das enzimas.

O gene referente a cada enzima foi amplificado pela técnica de PCR a partir do gene da quimera inserido no vetor pPICZ α A, purificado pelo kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Para amplificação do gene de cada enzima foram desenhados *primers* específicos a partir da sequência de suas respectivas proteínas, adicionado dos sítios de clivagem para as enzimas XhoI (CTCGAG) e Sall (GTCGAC), além da reconstrução do sítio de Kex2 (AAAAGA / AAGAGA), stop códon (TCA – antissenso) e a cauda de histidina (CATCATCATCATCATCAT) no caso da lipase devido a presença da *lid* na região C-terminal.

- *Primer* peptidase Senso/ Antissenso:
  - 5' – AAAC**CTCGAG**AAGAGACACCACCACCACCA – 3'
  - 5' – TTT**GTCGAC**TCA**GTGATGAATAGAAGAAGAGTTAGAACC** – 3'
- *Primer* lipase Senso/ Antissenso:
  - 5' –
AAAC**CTCGAG**AAAAGACATCATCATCATCATCAT**TCTCCTGTTGCTTT**
GGATGATT – 3'
  - 5' – TTT**GTCGAC**TCA**ACTTCTTGCCTGATTATTCTTAACATA** – 3'

2.2.5.1. Subclonagem e transformação em *Escherichia coli* DH10 β

O material amplificado por PCR foi submetido a corrida no sistema *E-gel precast agarose electrophoresis system* para certificar a separação das duas enzimas, uma vez que a lipase possui tamanho aproximado de 993 pb e a peptidase, 1164 pb.

O material amplificado que demonstrou melhor resolução foi quantificado através do Espectrofotômetro Nanodrop 1000 V 3.7 (Thermo). O produto então foi submetido a uma subclonagem a fim de criar estoques, em vetor pJET1.2 (figura 35). O kit utilizado para este fim, foi o *CloneJET PCR Cloning kit*, o material amplificado foi

200 µL de bactéria competente e foi então adicionado 10 µL de cada plasmídeo em seu respectivo tubo, incubados por 10 minutos em gelo, em seguida por 1 minuto e 30 segundos a 42°C, então transferido imediatamente para banho de gelo. Foi adicionado 800 µL de LB líquido *low salt* e incubado por 50-60 minutos a 37 °C.

O vetor pJET1.2 possui em sua sequência o gene de resistência para ampicilina, desta forma a seleção das colônias com insertos incorporados, foi dada pelo cultivo de placas com meio de cultura LB agar adicionado de 100 µg/mL de ampicilina (concentração final). As colônias isoladas foram cultivadas e o material purificado e submetido a PCR com *primer* específico (AOX) do vetor para confirmação da inserção do material genético de cada enzima.

2.2.5.2. Restrição e expressão em *P. pastoris*

Uma vez confirmada, foi necessária a transferência do material genético do vetor de clonagem para o vetor de expressão pPICZαA, para tanto foi realizada uma etapa de restrição. Ambos vetores pJET_Pep, pJET_Lip e vetor vazio pPICZαA foram submetidos à reação com a enzima XbaI por 3 horas a 37°C, seguida da reação com a enzima XhoI por 3 horas também a 37°C, sendo posteriormente inativada a 80°C por 20 minutos. Após a restrição, o material foi purificado utilizando Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) após corrida em gel de agarose 1 %. Os genes e vetor recuperados foram então ligados na presença da enzima T4 DNA Ligase (fermentas) por 16 horas a 16°C. Células de *E. coli* DH10B competentes foram transformadas por choque térmico a fim de incorporar o plasmídeo recombinante. Estas foram então plaqueadas em meio de cultura LB ágar contendo 25 µg/mL de Zeocina® (Invitrogen) e incubadas *overnight*, a 37°C. As colônias presentes no meio foram isoladas e submetidas a PCR de colônia. Esta técnica foi realizada na presença de 1 µL dos *primers* senso AOX do vetor e o *primer* antissenso específico de cada enzima, 2,5 µL de tampão, 0,75 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTPs, 0,5 µL da enzima Taq polimerase e 17,25 µL de água RNase/DNase *free*. As reações foram levadas ao termociclador e submetida a 5 minutos a 95 °C para destruição inicial da célula e desnaturação do DNA, seguido de 35 ciclos de – 1 minuto a 95 °C, 1 minutos e 30 segundos a 54 °C e 1 minuto e 10 segundos a 72 °C – a fim de desnaturar o DNA, anelar os *primer* e amplificação do material pela enzima Taq polimerase, e finalmente 5 minutos a 72 °C para certificação que todo

material foi amplificado (SUMMERS, 2015). Aquelas que demonstraram a presença do inserto foram submetidas a sequenciamento para comprovação da presença do inserto somente de uma enzima e não da quimera.

Após a confirmação, as bactérias com os novos plasmídeos pPICZαA _Pep e pPICZαA _Lip foram expandidas e então os plasmídeos foram purificados através do kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*, confirmados por sequenciamento e inseridos por eletroporação em células de *P. pastoris* competentes, como descrito no item (2.2.2). As etapas seguintes de *screening* foram realizadas da mesma forma como descritas para quimera.

2.3.Caracterização bioquímica funcional QuimLP – peptidase

O protocolo de atividade com azo-caseína como substrato foi baseado no ensaio realizado por Sarath e colaboradores (1996) com modificações na concentração de substrato e volumes de reação. A enzima purificada foi caracterizada por pH e temperatura ótimos e estabilidade, inibidores, íons e influência de surfactantes e agentes caotrópicos. Para caracterização do pH ótimo da peptidase pertencente à QuimLP, o ensaio foi realizado com azo-caseína 1% como substrato, preparada em tampões na faixa de 3,0 a 10,5 com incrementos de 0,5 (Acetato, pH 3,0 – 5,0; MES, pH 5,5 – 6,5; HEPES, pH 7,0 – 8,0; BICINE, pH 8,5 – 9,0; e CAPS, pH 9,5 – 10,5). Os volumes utilizados neste ensaio foram 20µL de quimera purificada, 80µL de tampão adequado ao pH desejado e 100µL de Azo-caseína 1%, estes foram incubados por 10 minutos a 45°C, depois deste tempo a reação foi interrompida com 400µL TCA (Ácido Tricloroacético) 10% (nos tubos brancos o TCA foi adicionado antes da azo-caseína afim de promover a inativação da enzima presente no meio). Estes foram centrifugados por 10 minutos a aproximadamente 10.000 x *g* em temperatura ambiente. Então foram coletados 100µL de sobrenadante e adicionados 117µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M aos tubos testes, que foram lidos em placas de usando microplacas de plástico contra seus respectivos brancos em 440nm, em leitor de microplacas (Molecular Devices).

A partir da determinação do pH ótimo, a temperatura ótima foi avaliada na faixa de 25°C a 70°C, com intervalos de 5°C. Os ensaios foram realizados da mesma forma como descrita acima, porém utilizando tampão MES pH 6,0 100mM.

Uma vez determinado o pH e a temperatura ótimos, esta condição foi utilizada para realização dos ensaios enzimáticos de inibidores (PMSF, EDTA e Ácido Iodoacético), íons (Sódio, Magnésio, Manganês, Cobalto, Cálcio, Potássio, Zinco, Lítio, Cobre, Bário e Alumínio), surfactantes (Tween 80 – Tw, CTAB, Triton X-100 – Tx e SDS) e agentes caotrópicos (Cloridrato de guanidina – Gn, Ureia – Ur e DTT).

Os ensaios de pH de estabilidade foram realizados com a incubação prévia do extrato enzimático ao volume de 40uL dos tampões a serem analisados a 100mM no pH de 4,0 a 10,0, por 1 hora de incubação a 25°C. Para a realização do ensaio foram adicionados mais 40uL do tampão MES pH 6,0 150mM assim prosseguindo a reação enzimática já descrita anteriormente.

Os testes de estabilidade de temperatura foram realizados com a incubação prévia do extrato enzimático nas temperaturas de 30 a 60°C por 5, 15, 30 e 60 minutos. Prosseguindo o ensaio como descrito anteriormente.

Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar o aumento de 0,001A_{440nm} dentro das condições de reações usando caseína como substrato (SARATH et al, 1996).

3. RESULTADOS

3.1. Obtenção de enzima bifuncional composta por peptidase e lipase

As sequências selecionadas foram submetidas a análises *in silico* utilizando o Interpro scan e os resultados apresentados nas figuras 36D e 37D que corroboraram com a análise funcional desejadas de proteólise e lipólise, bem como a identificação de domínios pertencentes às peptidases e lipases, respectivamente (Figuras 36B e C e 37B e C).

Figura 36. (A) Sequência de aminoácidos da peptidase proveniente de *F. oxysporum*, subtilisina-like; **(B)** domínios identificados; **(C)** anotações de resíduos; **(D)** característica biológica e função molecular da peptidase; informações obtidos a partir do software online Interpro scan.

FONTE: Di Pietro et al., 2001; Interpro scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>)

Figura 37. (A) Sequência de aminoácidos da lipase proveniente de *F. oxysporum*; **(B)** domínios identificados; **(C)** anotação de resíduos; **(D)** característica biológica da lipase; informações obtidos a partir do software online Interpro scan.

FONTE: Interpro scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

Uma vez determinadas as sequências, foi necessária uma análise estrutural para determinação da posição de cada hidrolase na quimera, para tanto a obtenção de modelos estruturais foi necessária. Para lipase, o modelo utilizado foi a lipase do fungo *Thermomyces lanuginosus*, de identificação 4S0X encontrada no banco de dados de proteínas RSCB PDB. O modelo da peptidase foi gerado pelo banco de dados online PSI (*Protein Structure Initiative Knowledgebase*), a proteína que se aproximou mais à sequência da peptidase selecionada foi a proteinase K do fungo *Parengyodontium album* com cobertura de 61%, cuja identificação no RSCB PDB é 3DYB. Após essa comparação com as estruturas modelo foi possível sugerir que o sítio ativo da lipase está espacialmente próximo a sua região C-terminal (figura 38B), enquanto a peptidase demonstrou que as regiões amino ou carboxi terminal da enzima localizam-se distante do seu sítio ativo (figura 38A). Além disso, foi possível observar que a *lid* da lipase também se encontra próxima à região C-terminal.

A tecnologia de DNA recombinante e expressão heteróloga é caracterizada também pela utilização de cromatografia por afinidade pela adição de uma calda de histidina à sequência do inserto. Para formação completa da sequência da quimera (Figura 39A), observamos que esta calda não poderia se localizar na extremidade C-terminal da lipase, uma vez que as regiões determinantes para atividade lipolítica se encontram próximas a ela. Portanto, a construção do gene da quimera deu-se pela

ligação primeiro da peptidase seguida do *linker*, GGAGG, e por último a lipase, a fim de conservar a atividade catalítica.

Figura 38. Estruturas modelos para determinação da ordem da enzima bifuncional: **(A)** modelo obtido pelo software online PSI (*The Protein Model Portal*), de identificação 3DYB – proteinase K, cuja sequência cobriu 61% da sequência da peptidase de interesse; **(B)** modelo de lipase de *Thermomyces lanuginosus*, de identificação 4S0X, cuja *lid* está identificada pela região destacada. As setas indicam os aminoácidos que compõem o sítio ativo de ambas enzimas, bem como a presença do íon cálcio na peptidase. Estruturas analisadas pelo programa CCP4MG Version 2.10.6.

Além da análise estrutural para determinação da sequência final da quimera, também foi realizada uma análise *in silico* pelo software Interpro scan, a fim de confirmar se a adição destas novas sequências poderia interferir nos domínios de cada enzima separadamente, ou ainda em suas funções (figura 39).

Figura 39. (A) Sequência de aminoácidos da enzima bifuncional (quimera) proveniente de sequências de *F. oxysporum*; **(B)** domínios identificados; **(C)** anotação de resíduos; **(D)** característica biológica da quimera; informações obtidos a partir do software online Interpro scan.

Uma vez determinada a sequência da quimera, esta foi fabricada já em seu vetor de expressão (pPICZαA). A fim de confirmar a presença do inserto, o plasmídeo foi submetido a metodologia de PCR convencional. Uma vez inserido o vetor de expressão com inserto (pPICZαA-Quimera) no microrganismo *P. pastoris*, foi

realizado um *screening* com várias cepas que apresentaram crescimento em placas adicionadas de antibiótico (Figura 40).

Após esta seleção, as colônias foram coletadas, inoculadas em meio apropriado e submetidas ao processo de indução com metanol. O perfil de proteínas produzido foi analisado em SDS-PAGE e atividade *in situ* por zimograma, já que o extrato bruto possuía atividade proteolítica e lipolítica intrínseca.

Figura 40. Perfil proteico e de atividade *in situ* de duas cepas diferentes de *Pichia pastoris* transformadas com inserto pPICZαA-Quimera. **(A)** Fotografia com as cepas de *P. pastoris* transformadas com inserto pPICZαA-Quimera. As colônias circuladas deram origem as amostras 3 e 4. **(B)** Perfil em gel SDS/PAGE 12% de proteínas secretadas no extrato bruto após processo de indução com metanol. **(C)** Atividade lipolítica *in situ* utilizando zimograma de lipase para determinação da atividade da quimera. **(1)** Marcador LMW (Ge Life Sciences) e os respectivos padrões de massas moleculares; **(2)** Extrato bruto de indução com *P. pastoris* sem inserto, como controle de produção; **(3)** Extrato bruto de indução com *P. pastoris* com inserto, porém sem atividade da quimera; **(4)** Extrato bruto de indução com *P. pastoris* com inserto, porém com atividade da quimera.

Com a cepa selecionada e determinado o tempo de produção em 72 horas de indução (Figura 41), a purificação da enzima bifuncional foi prosseguida pela utilização de cromatografia por afinidade. Seu perfil cromatográfico está apresentado na figura 42, onde podemos observar o desligamento da proteína de interesse com aproximadamente 15% de imidazol, promovendo assim a purificação da enzima bifuncional.

Figura 41. Perfil proteico do extrato bruto da indução da enzima bifuncional produzida por *P. pastoris* durante 144 horas. As amostras foram induzidas por diferentes períodos de tempo: **(1)** 24 horas; **(2)** 48 horas; **(3)** 72 horas; **(4)** 96 horas; **(5)** 120 horas; **(6)** 144 horas; **(M)** Marcador LMW (Ge Life Sciences) e os respectivos padrões de massas moleculares.

Figura 42. Cromatograma da purificação da enzima bifuncional produzida por *P. pastoris*.

Na figura 43A podemos observar os géis fotografados e analisados pelo software *Image Lab 5.2.1*, onde a banda purificada foi calculada com a massa molecular entre 55 e 59 kDa. Os zimogramas específicos para atividade proteolítica e lipolítica apresentados nas figuras 43B e 43C, comprovam a presença de somente uma enzima com ambas atividades enzimáticas. A diferença observada na massa molecular entre o gel desnaturante e os zimogramas deu-se pela composição do gel, uma vez que os zimogramas possuem gelatina em sua malha, e o fato de que a enzima está em sua conformação não desnaturada.

Figura 43. Perfil proteico e de atividade *in situ* da fração purificada contendo a enzima bifuncional recombinante produzida por *P. pastoris*. **(A)** Perfil em gel SDS/PAGE 12%; **(B)** Atividade proteolítica *in situ* utilizando zimograma com gelatina 0,1% como substrato; **(C)** Atividade lipolítica *in situ* utilizando zimograma de lipase com 4-metilumbeliferil butirato como substrato; **(M)** Marcador LMW (Ge Life Sciences) e os respectivos padrões de massas moleculares.

3.2.Caracterização bioquímica funcional Quimera – peptidase

Após a obtenção da enzima bifuncional, iniciamos a caracterização pela atividade proteolítica. A melhor atividade proteolítica foi apresentada em pH 6,0 com queda abrupta em pH abaixo de 5,0 e acima de 8,5 (Figura 44A). A temperatura ótima da peptidase na quimera foi de 55°C com menor atividade em 65 e 70°C (Figura 44B).

Figura 44. Efeito de pH **(A)** e temperatura **(B)** na atividade proteolítica com substrato azo-zaseína da enzima bifuncional pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

A estabilidade determinada após 1 hora de exposição aos diferentes pH foi demonstrada pela figura 45A, podemos observar que a atividade proteolítica foi mantida acima de 70% na faixa de pH entre 7,0 e 9,0, e aproximadamente 60% nos pH 9,5 e 10,0. Quando analisada a estabilidade da enzima frente a diferentes temperaturas em tempos de exposição crescentes, a enzima foi estável mantendo

acima de 80% da atividade inicial nas temperaturas de 30 a 40°C em até 60 minutos e 70-50% a 45°C neste mesmo período. Somente nas temperaturas de 50 a 60°C) foi observado uma perda acentuada de atividade enzimática (figura 45B).

Figura 45. Avaliação da estabilidade em pH (A) e temperatura (B) na atividade proteolítica da enzima bifuncional pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

Afim de determinar a classe da peptidase, foram realizados ensaios com diferentes inibidores, cujo resultado está demonstrado na Tabela 9.

De acordo com a inibição demonstrada pelo EDTA e PMSF, a enzima é uma serino peptidase dependente de metal para sua atividade.

Tabela 9. Efeito de inibidores na atividade proteolítica da enzima bifuncional pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

Inibidores (5mm)	Atividade relativa (%)
Controle	100±3
AIA	120±4
PMSF	54±5
EDTA	5±1

A Tabela 10 mostra a influência de íons na atividade proteolítica da quimera. Podemos observar que na concentração de 1 mM de cada sal, a enzima sofreu influência negativa dos íons Cu^{2+} e Co^{2+} e quando incubada com 5 mM dos mesmos sais, a modulação negativa é apresentada pelos mesmos íons com a adição do Zn^{2+} . O íon Al^{3+} manteve a atividade em ambas concentrações, bem como os íons monovalentes Li, Na e K na menor concentração. O restante dos íons divalentes e a concentração maior dos íons monovalentes apresentaram uma modulação positiva na atividade proteolítica, com destaque ao íon Ca^{2+} , onde observamos um aumento

de 45% na concentração de 1 mM e de até 75% quando incubado com 5 mM de CaCl_2 .

Tabela 10. Efeito de íons na atividade proteolítica da quimera pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

Sais	Atividade relativa (%) [1 mm]	Atividade relativa (%) [5 mm]
Controle	100±7	
CaCl_2	145±8	175±6
BaCl_2	127±5	159±5
MgCl_2	113±9	145±5
MnCl_2	143±14	128±1
LiCl	109±1	132±5
NaCl	100±5	115±7
KCl	98±1	134±2
AlCl_3	97±4	100±11
CoCl_2	82±10	83±6
ZnCl_2	-	6±2
CuCl_2	6±2	6±1

A influência de surfactantes foi apresentada na figura 46, onde podemos observar o efeito desnaturante dos detergentes iônicos SDS e CTAB, bem como o efeito negativo provocado pela presença do surfactante não iônico Triton X-100 (Tx) com uma queda de atividade de 70% na concentração de 0,5% do detergente. Já o surfactante não iônico Tween 80 (Tw) afetou positivamente a atividade a partir de 1%.

Figura 46. Avaliação do efeito de surfactantes sobre a atividade proteolítica da quimera pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

O agente sulfidrílico DTT demonstrou um aumento na atividade enzimática em concentrações de 10 a 50 mM e diminuição acima de 50% da atividade em todas as concentrações de ureia (Ur) e cloridrato de guanidina (Gn) analisados, bem como de 100 e 200 mM do agente DTT (figura 47).

Figura 47. Efeito de agentes caotrópicos e DTT na atividade proteolítica da quimera pura produzida por expressão heteróloga em *P. pastoris*.

As características bioquímicas de peptidase pertencente a quimera estão resumidas na tabela 12, nos apêndices.

3.3. Clonagem das enzimas peptidase e lipase heterólogas separadas

O processo de separação das enzimas descrito no item (2.2.5) foi comprovado por géis apresentados a seguir (figuras 48 e 49). Após amplificação do material a partir do vetor purificado da quimera pela utilização de *primers* específicos, sequencialmente foi inserido no vetor pJET1.2 e expandido em *E. coli*. Uma vez selecionada, as cepas foram submetidas a PCR de colônia para comprovação da presença do plasmídeo (Figura 48A e 48B).

O cálculo obtido pelo software *Image Lab 5.2.1*, as bandas produzidas pelo PCR foram de aproximadamente 1400 e 1300 pb da peptidase e lipase, respectivamente. Estes valores foram maiores que os esperados (1164 e 1011 pb), porém é possível que seja devido à corrida ou ao marcador.

Figura 48. Material amplificado referente a **(A)** Peptidase e **(B)** Lipase após o PCR de colônia realizado para os insertos de modo separado. A raia indicada por **M**, indica o marcador E-Gel® 96 High Range DNA Marker cujo os valores dos respectivos padrões de bandas são 10000, 4000, 2000, 800 e 400 pb, sequencialmente.

Para transferir o material do vetor de clonagem para o vetor de expressão através de reações de restrição dos materiais amplificados e o vetor pPiczαA (Figura 49).

Figura 49. Reação de restrição **(1)** lipase; **(2)** peptidase; **(3)** pPiczαA. A raia indicada por **M**, indica o marcador E-Gel® 96 High Range DNA Marker cujo os valores dos respectivos padrões de bandas são 10000, 4000, 2000, 800 e 400 pb, sequencialmente.

Uma vez inserido em pPiczαA, cada enzima foi submetida a sequenciamento, a fim de comprovar a presença somente de uma enzima e não mais da quimera (Figuras 50 e 51).

Figura 50. Sequenciamento para comprovação da presença do material genético (Peptidase), sem a presença da lipase. (-) Sequência da peptidase obtida pelo banco de dados; (-) Sequência obtida com material gerado da amplificação da peptidase pelo gene da quimera.

Genomic map of the RevComp_prot_A0X gene on chromosome 10. The map shows the gene structure with exons and introns, and a detailed view of the RevComp_prot_A0X gene structure. The gene is located on chromosome 10, spanning from position 1,171,171 to 1,171,171. The gene structure shows 11 exons and 10 introns. The RevComp_prot_A0X gene structure is shown in detail, with the gene name and the gene structure. The gene is located on chromosome 10, spanning from position 1,171,171 to 1,171,171. The gene structure shows 11 exons and 10 introns. The RevComp_prot_A0X gene structure is shown in detail, with the gene name and the gene structure.

Figura 51. Sequenciamento para comprovação da presença do material genético amplificado (Lipase), sem a presença da peptidase. (-) Sequência da lipase obtida pelo banco de dados; (-) Sequência obtida com material gerado da amplificação da lipase pelo gene da quimera.

3.4.Desafios

Em relação à quimera, foi observado uma queda proeminente na atividade proteolítica e lipolítica, enquanto a purificação estava em andamento. Bem como, de acordo com o fluxo de reações de atividade enzimática, onde a alíquota purificada era exposta a temperaturas amenas. Isto dificultou a caracterização da lipase, e hipotetizamos que a presença da peptidase na estrutura da quimera era a responsável pela queda da atividade lipolítica. Para confirmar essa hipótese foi realizado um gel desnaturante de uma alíquota descongelada e na figura 52, podemos observar, pelo padrão de bandas, o perfil de hidrólise da quimera mediado pela peptidase presente em sua própria estrutura. A ausência de uma banda única representando a quimera (55-59 kDa) indica que a estrutura foi clivada e, consequentemente, perdeu sua atividade.

Figura 52. Perfil de auto-hidrólise da quimera pela peptidase em sua estrutura.

Por esse mesmo motivo, a caracterização da lipase_quimera foi dificultada, e embora tenhamos determinado o pH ótimo da mesma como 11,0 (Figura 53, apêndices). Na figura 54 (apêndices), a determinação da temperatura ótima mostrou a perda de atividade nas temperaturas de 30 e 40 °C, enquanto que as maiores atividades foram observadas em temperaturas mais brandas (25 e 30 °C) ou entre 45 e 70 °C. Também foi possível observar que nas condições onde há um aumento na atividade proteolítica houve um decréscimo na atividade lipolítica corroborando a hipótese anteriormente proposta (Figura 44B e 54, apêndices). Sendo assim, novas estratégias são necessárias para a caracterização da lipase presente na enzima bifuncional.

Por fim, o trabalho de separação das enzimas peptidase e lipase foi feito com sucesso como observamos anteriormente pelos sequenciamentos. A etapa seguinte de expressão utilizando a levedura *P. pastoris* para o *screening* inicial e seleção de cepas não foi conclusivo. Esses resultados demonstram um dos gargalos para a produção recombinante dessa quimera e, por isso a repetição destes ensaios será necessária.

4. DISCUSSÃO

As subtilisinas-*like*, são serino peptidases da segunda maior família reconhecida de acordo com *MEROPS database*. Os fungos secretam subtilisinas para adquirir nutrientes e quebrar barreiras de hospedeiros (BAGGA et al., 2004), desta forma podemos inferir que as subtilases (subtilisina-*like* produzidas por fungos) podem possuir características inespecíficas e de resistência, para tanto ela foi escolhida para compor a enzima bifuncional. As subtilisinas possuem aplicações em detergentes, na produção peptídeos bioativos, na indústria do couro e têxtil, no processamento de alimentos e alimentação de animais, entre outras (ARAÚJO; CAVACO-PAULO; CASAL, 2008; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

No contexto das aplicações das subtilisinas, a seleção da outra hidrolase deu-se pela similaridade da sequência de uma lipase de *F. oxysporum* e a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, cujas características são de termotolerância e alcalinidade (ZHENG et al., 2011), perfil ideal para aplicações em detergentes, tratamento de efluentes, na indústria têxtil, entre outras (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

O sistema de expressão selecionado para obtenção da quimera e das enzimas separadas foi eficiente, uma vez que foi possível detectar a presença da enzima bifuncional no extrato bruto proveniente da indução com metanol e o sequenciamento das enzimas separadas comprovou a presença no vetor de expressão. A etapa de purificação foi apropriada e seguiu o esperado em uma purificação por afinidade, uma vez que a presença da cauda de histidina na construção da sequência possibilitou a ligação à resina Ni sepharose® e desligamento em baixas porcentagens de imidazol.

A caracterização da peptidase deu-se pela utilização de azocaseína, substrato derivado cromogênico da caseína que facilita na solubilização do substrato pela adição do grupo sulfonamida, além de promover uma cor alaranjada ao reagente. Quando hidrolisada por peptidases o substrato libera pequenos componentes coloridos solúveis na presença de TCA, sendo possível a leitura espectrofotométrica na região do visível 440nm (CHARNEY & TOMARELLI, 1947; SARATH et al, 1996).

As características gerais em relação ao pH e temperatura da peptidase_quimera e outras subtilisinas estão apresentadas na tabela 11. Diferentes perfis são apresentados, apesar da peptidase_quimera ter apresentado um pH ótimo de 6,0, a

atividade catalítica foi detectada na faixa entre 5,0 a 8,0, diferente da maioria que se mostraram mais alcalinas. Da mesma forma, a peptidase_quimera foi mais estável que as demais (considerando pelo menos a manutenção de 50% da atividade entre 30 a 60 minutos). A peptidase_quimera apresentou o pico de atividade em 55°C, porém em temperaturas amenas também proporcionou atividade catalítica, perfil também encontrado na subtilisina de *Pleurotus ostreatus* expressa em *E. coli*. Quanto à estabilidade em temperatura, a peptidase_quimera possui perfil próximo à subtilisina apresentada por Pekkarinen et al (2002).

Tabela 11. Comparação de características bioquímicas de diferentes subtilisinas.

Enzima	pH otm*	pH est**	T°C otm*	T°C est**	Organismo origem/expresso***	Autor
Peptidase Subtilisina- like	6,0	4,0-10,0	55°C	30-45°C	<i>F. oxysporum/P. pastoris</i>	Atual
	10,0	-	60°C	30-35°C	<i>F. equiseti/Trichoderma reesei</i>	Juntunen et al., 2015
	8,0	7,0-10,0	60°C	30-70°C	<i>Bacillus caseinilyticus/Nativa</i>	Mothe et al., 2016
	7,0	-	25-37°C	25-55°C	<i>Streptococcus suis/E. coli</i>	Bonifait et al., 2011
	7,5	6,5-9,5	40°C	10-50°C	<i>Pleurotus ostreatus/E. coli</i>	Eisele et al., 2011
	9,0	4,1-7,7	40°C	25-40°C	<i>F. culmorum/Nativa</i>	Pekkarinen et al., 2002

O perfil de inibição pelo EDTA e PMSF era esperado, uma vez que as subtilisinas são serino peptidases e possuem um ou dois sítios de ligação de Ca^{2+} (Ca-I – ligação forte, e Ca-II – ligação fraca) e ocasionalmente um sítio de ligação de Na^+ , que contribuem para estabilização da enzima (SIEZEN; LEUNISSEN, 1997).

Assim, podemos observar o aumento da atividade proteolítica na presença de Ca^{2+} nas concentrações de 1 e 5 mM. Contudo, outros íons divalentes e monovalentes modularam positivamente a atividade da peptidase_quimera. Apesar de características diferentes, tais como raio atômico, valência ou eletronegatividade, estes íons podem ocupar o lugar do Ca^{2+} em seu sítio, não da mesma forma, por vezes deslocado, porém eficientes ao ponto de aumentar a atividade catalítica. Os íons Zn^{2+} e Cu^{2+} , foram responsáveis pela modulação negativa à atividade da peptidase_quimera. Podsiadlo et al (2004) analisaram o efeito destes íons em duas subtilisinas diferentes (Furin e Kex2), o mecanismo discutido foi a ligação destes íons a subsítios presentes no sítio ativo, interferindo diretamente na ligação do substrato, consequentemente na atividade catalítica.

A influência de surfactantes demonstrou um efeito negativo dos detergentes iônicos independente do CMC, resultado da interação das regiões carregadas da proteína e do surfactante, bem como captura do íon Ca^{2+} (STAUFFER; TREPTOW, 1973). Os detergentes não-iônicos produziram diferentes perfis, o aumento da

concentração do Triton X-100 proporcionou também um aumento na inibição. Em contrapartida, Tween®80 apresentou o perfil inverso, onde o detergente promoveu o aumento da atividade provavelmente pela estabilização da estrutura tri-dimensional, preservando a conformação correta da enzima (GUNCHEVA; STIPPLER, 2016).

DTT afeta as pontes de dissulfeto presentes nas proteínas, em diversas subtilezas forma encontradas estas pontes, desta forma este agente redutor pode afetar a estrutura da proteína, favorecendo ou não sua atividade. Em concentrações menores de 50 mM, o agente redutor DTT apresentou um efeito positivo, enquanto em concentrações de 100 e 200 mM o efeito foi negativo. Os agentes caotrópicos afetaram negativamente a atividade em todas as concentrações testadas, devido à desorganização da estrutura pela quebra das pontes de hidrogênio.

5. CONCLUSÃO

A produção da enzima bifuncional com atividade proteolítica e lipolítica foi realizada com sucesso, apesar da quimera possuir uma atividade proteolítica abundante a ponto de promover uma auto-hidrólise inevitável. Espera-se que uma vez em meio rico em proteínas e lipídeos, a enzima possa ter um resultado promissor.

As características determinadas para peptidase são interessantes, já que demonstrou versatilidade e estabilidade frente a diferentes condições e compostos externos. Sendo viável a diversas aplicações biotecnológicas. A fim de determinar a aplicação mais adequada, será necessária a caracterização da lipase, inibindo a atividade da peptidase. Além disso a caracterização das enzimas isoladas é interessante para traçar um paralelo entre especificidade e diferentes características apresentadas pelas enzimas na quimera e separadas.

REFERÊNCIAS

- ABIDI, F. et al. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2301–2310, 2011.
- ABIDI, F.; LIMAM, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202–1208, 2008.
- AHMAD, M. et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 12, p. 5301–5317, 2014.
- AKTA purifier user manual. Uppsala: General Electric Company, 1992. Disponível em:
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1345792640127/litdoc29119969_20161015145723.pdf>. Acesso: 10 out 2016.
- AKTA avant user manual. Uppsala: General Electric Company, 2015. Disponível em:
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1366817416782/litdoc29035184_20161015210259.pdf>. Acesso: 10 out 2016.
- ALLISON, S. D.; VITOUSEK, P. M. Responses of extracellular enzymes to simple and complex nutrient inputs. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 937–944, 2005.
- ÂNGELO, T.; RODRIGUES, R.; CABRAL, H. Concomitant Production of Peptidases and Lipases by Fungus Using Agro- industrial Residue in Solid-state Fermentation. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 3, n. 5, p. 810–823, 2014.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: A review. **Bioresource Technology**, v. 64, n. 3, p. 175-183, 1998.
- ARAÚJO, R.; CASAL, M.; CAVACO-PAULO, A. Application of enzymes for textile fibres processing. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 5, p. 332–349, 2008.

ARAÚJO, R.; CAVACO-PAULO, A.; CASAL, M. Strategies towards the functionalization of subtilisin E from *Bacillus subtilis* for wool finishing applications. **Engineering in Life Sciences**, v. 8, n. 3, p. 238–249, 2008.

ARAVINDAN, R.; ANBUMATHI, P.; VIRUTHAGIRI, T. Lipase applications in food industry. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 141–148, 2007.

ARDNT, K.; MULLER, K. M. Protein Engineering Protocols. In: CLIFTON, N. J. (Ed.). **Series: Methods in molecular biology**, New Jersey: Humana Press. 2007. V. 352.

ARPIGNY, J. L.; JAEGER, K.-E. E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. **The Biochemical journal**, v. 343 Pt 1, n. 1, p. 177–183, 1999.

BAGGA, S. et al. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Gene**, v. 324, n. 1–2, p. 159–169, 2004.

BARATA, R. A. et al. Purification and characterization of an extracellular trypsin-like protease of *Fusarium oxysporum* var. lini. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 94, n. 4, p. 304–8, 2002.

BARRET, A. J. Proteolytic enzymes: nomenclature and classification. In: BEYNON, ROBERT; BOND, J. S. (Ed.). **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Second Edition. Oxford 2001. p. 1–22.

BATT, C. A. et al. *Pichia pastoris*. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**. Second Edition. Elsevier, 2001. v. 3p. 629–633.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Biochemistry. In: **Biochemistry textbook**. 2010. p. 1026.

BINOD, P. et al. Industrial enzymes - Present status and future perspectives for india. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 72, n. 5, p. 271–286, 2013.

BIRLA, S. S. et al. Rapid Synthesis of Silver Nanoparticles from *Fusarium oxysporum* by Optimizing Physicocultural Conditions. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.

BONIFAIT, L. et al. Purification and characterization of the subtilisin-like protease of *Streptococcus suis* that contributes to its virulence. **Veterinary Microbiology**, v. 148,

n. 2–4, p. 333–340, 2011.

BORKAR, P. S. et al. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 40, n. 2, p. 358–66, 2009.

BORRELLI, G. M.; TRONO, D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774-20840, 2015.

BOZORGMEHR, M. R.; HOUSAINDOKHT, M. R. Effects of Sodium Dodecyl Sulfate Concentration on the Structure of Bovine Carbonic Anhydrase : Molecular Dynamics Simulation Approach. **Romanian Journal of Biochemistry**, v. 15, n. 6, p. 3–15, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRADY, L. et al. A Serine Protease Triad Forms the Catalytic Centre of a Triacylglycerol Lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767–770, 1990.

BRUEL, L. et al. α -galactosidase/sucrose kinase (AgaSK), a novel bifunctional enzyme from the human microbiome coupling galactosidase and kinase activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 47, p. 40814–40823, 2011.

CARMONA, A. K.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L. The use of Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) peptides for measurement of clinically important proteolytic enzymes. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, n. 3, p. 381–92, 2009.

CASAS-GODOY, L. et al. Lipases: An overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 861, p. 3-30, 2012.

CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrates for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 419–425, 1991.

CHALFOUN, N. R. et al. Purification and characterization of AsES protein: A subtilisin secreted by *acremonium strictum* is a novel plant defense elicitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 20, p. 14098–14113, 2013.

CHANDRASEKARAN, M. et al. Proteases from phytopathogenic fungi and their importance in phytopathogenicity. **Journal of General Plant Pathology**, v. 82, n. 5, p. 233–239, 2016.

CHANDRASEKARAN, M.; SATHIYABAMA, M. Production, partial purification and characterization of protease from a phytopathogenic fungi *Alternaria solani* (Ell. and Mart.) Sorauer. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, n. 8, p. 763–774, 2014.

CHARLES, P. et al. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 347–352, 2008.

CHERIF, S. et al. A newly high alkaline lipase: an ideal choice for application in detergent formulations. **Lipids in health and disease**, v. 10, p. 221, 2011.

COOLBEAR, T.; WHITTAKER, J. M.; DANIEL, R. M. The effect of metal ions on the activity and thermostability of the extracellular proteinase from a thermophilic *Bacillus*, strain EA.1. **The Biochemical journal**, v. 287 (Pt 2, p. 367–374, 1992.

COPELAND, A. R. **Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis**. Second edition, 2000.

COSTA, V. E. U.; DE AMORIM, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Química Nova**, v. 22, n. 6, p. 863–873, 1999.

CREGG, J. M. et al. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 3, p. 1316–23, 1989.

CREGG, J. The *Pichia* System. **Keck Graduate Institute, Claremont, Calif**, p. 1–8, 1993.

CYCLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods in Enzymology**, v. 284, p. 3–27, 1997.

DA SILVA, R. R. et al. The identification and biochemical properties of the catalytic specificity of a serine peptidase secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Protein and peptide letters**, v. 21, n. 7, p. 663–671, 2014.

DA SILVA, R. R. et al. Evaluation of the catalytic specificity, biochemical properties, and milk clotting abilities of an aspartic peptidase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, p. 1059–1069, 2016.

DA SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de leishmania: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1541–1548, 2010.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 297–306, 2009.

DI PIETRO, A. et al. Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 14, n. 5, p. 653–662, 2001.

DI PIETRO, A. et al. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. **Molecular Plant Pathology**, v. 4, n. 5, p. 315–325, 2003.

DOI, N.; YANAGAWA, H. Insertional gene fusion technology. **FEBS letters**, v. 457, n. 1, p. 1–4, 1999.

DOS PRAZERES, J. N.; CRUZ, J. A. B.; PASTORE, G. M. Characterization of alkaline lipase from *Fusarium oxysporum* and the effect of different surfactants and detergents on the enzyme activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 4, p. 505–509, 2006.

DUDEV, T.; LIM, C. Competition among metal ions for protein binding sites: Determinants of metal ion selectivity in proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 1, p. 538–556, 2014.

DUONG-LY, K. C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. **Methods in Enzymology**, v. 541, p. 85–94, 2014.

DWEVEDI, A. Enzyme immobilization: an important link between agriculture and industries. In: **Enzyme immobilization: Advances, in Industry, agriculture,**

medicine and the environment. 1st. ed. Switzerland: Springer International Publishing, 2016. p. 45–64.

EISELE, N. et al. Heterologous expression, refolding and characterization of a salt activated subtilase from *Pleurotus ostreatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 9, p. 1840–1846, 2011.

ELSEVIER. **The colors of biotechnology**. Disponível em:
<<https://www.elsevier.com/life-sciences/biotechnology>>. 2016.

EVNIN, L. B.; VASQUEZ, J. R.; CRAIK, C. S. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, n. 17, p. 6659–6663, 1990.

FARADY, C. J.; CRAIK, C. S. Mechanisms of Macromolecular Protease Inhibitors. **ChemBioChem**, v. 11, p. 2341–2346, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 167-212, 2010.

FICKERS, P. et al. Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, n. 3, p. 264–274, 2005.

FISHER, D. I.; GUTTIERI, M. C.; LIANG, M. Expression Systems. In: BRADSHAW, R. A.; STAHL, P. D. (Ed.). **Encyclopedia of cell biology**, Waltham Academic Press, 2016. v. 248 p. 54-65.

FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 24, n. 2, p. 234-237, 2006.

FLEURI, L. F. et al. Production of fungal lipases using wheat bran and soybean bran and incorporation of sugarcane bagasse as a co-substrate in solid-state fermentation. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 4, p. 1199–1205, 2014.

FOJAN, P. et al. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. **Biochimie**, v. 82, n. 11, p. 1033–1041, 2000.

FOSTER, A. W.; OSMAN, D.; ROBINSON, N. J. Metal preferences and metallation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 41, p. 28095-28103, 2014.

FURTADO, G. P. et al. A designed bifunctional laccase/ β -1,3-1,4-glucanase enzyme shows synergistic sugar release from milled sugarcane bagasse. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 26, n. 1, p. 15–23, 2013.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 6, p. 621–634, 1997.

GOPINATH, S. C. B. et al. Strategies to characterize fungal lipases for applications in medicine and dairy industry. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GRAMINHO, E. R. et al. Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 201–214, 2013.

GUNCHEVA, M.; STIPPLER, E. Effect of four commonly used dissolution media surfactants on pancreatin proteolytic activity. *AAPS PharmSciTech*, n. 12, 2016.

GUPTA, R. et al. Biotechnological applications and prospective market of microbial keratinases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 23, p. 9931-9940, 2013.

GUPTA, R. et al. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. **Progress in Lipid Research**, v. 57, p. 40-54, 2015.

GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

GUZMAN, M. L. et al. Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin. **Results in Pharma Sciences**, v. 6, p. 15–19, 2016.

HANSEN, G. H. et al. Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 9, p. 1327-1341, 2015.

HASAN, F. et al. Enzymes used in detergents: Lipases. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 31, p. 4836–4844, 2010.

HOSHINO, T. et al. Purification and Some Characteristics of Extracellular Lipase from *Fusarium oxysporum* f. sp. lini. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 4, p. 660–664, 1992.

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases: industrial uses. In: SCHAECHTER, M. (Ed.). **Encyclopedia of Microbiology**. Oxford, UK: Elsevier Ltd., 2009. p. 385–392.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and Their Industrial Applications: An Overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 118, p. 155-170, 2004.

ISHIDA, K. et al. Silver nanoparticle production by the fungus *Fusarium oxysporum*: Nanoparticle characterisation and analysis of antifungal activity against pathogenic yeasts. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 220–228, 2014.

JAEGER, K. E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annual review of microbiology**, v. 53, p. 315–51, 1999.

JAEGER, K.-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–7, ago. 2002.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457-470, 2008.

JUNTUNEN, K. et al. A New Subtilase-Like Protease Deriving from *Fusarium equiseti* with High Potential for Industrial Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 177, n. 2, p. 407–430, 2015.

KANWAR, S. S. et al. Methods for inhibition of residual lipase activity in colorimetric assay: A comparative study. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 42, n. 4, p. 233–237, 2005.

KARIMI JASHNI, M. et al. Synergistic action of serine- and metallo-proteases from *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici cleaves chitin-binding tomato chitinases, reduces their antifungal activity and enhances fungal virulence. **Molecular Plant-**

Microbe Interactions, v. 28, n. 9, p. 150427105219007, 2015.

KEIL, B. **Specificity of proteolysis**. 1992. 352f.

KIM, G. J.; LEE, D. E.; KIM, H. S. Construction and evaluation of a novel bifunctional N-carbamylase-D-hydantoinase fusion enzyme. **Applied and environmental microbiology**, v. 66, n. 5, p. 2133–8, 2000.

KLEMENCIC, I. et al. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5404–5412, 2000.

KOCH, A. L. The macroeconomics of bacterial growth. In: **Bacteria in their Natural Environments**. 1985. v. 16p. 1–42.

KUMAR, A.; SINGH, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 4, p. 365–78, 2013.

KUMAR, D. et al. Microbial proteases and application as laundry detergent additive. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 661-672, 2008.

KUWAJIMA, K. et al. Kinetics of disulfide bond reduction in .alpha.-lactalbumin by dithiothreitol and molecular basis of superreactivity of the Cys6-Cys120 disulfide bond. **Biochemistry**, v. 29, n. 36, p. 8240–8249, 1990.

KWON, H. W. et al. Detection of extracellular enzyme activities in various *Fusarium* spp. **Mycobiology**, v. 35, n. 3, p. 162–165, 2007.

LADEIRA, S. A. et al. Utilização de resíduos agroindustriais para A produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: Otimização do meio de cultura usandoa técnica de planejamento experimental. **Quimica Nova**, v. 33, n. 2, p. 324–328, 2010.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. **Nature**, v. 227, 1970.

LEVIC, J. et al. *Fusarium* species: The occurrence and the importance in agriculture of Serbia. **Zbornik Matice srpske za prirodne nauke**, n. 116, p. 33–48, 2009.

LIU, R. et al. A novel low-temperature resistant alkaline lipase from a soda lake fungus strain *Fusarium solani* N4-2 for detergent formulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, n. 3, p. 265–270, 2009.

LODS, L. M. et al. The future of enzymes in cosmetics. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 22, n. 2, p. 85-94, 2000.

LU, P. et al. Construction and characterization of a bifunctional fusion enzyme of Bacillus-sourced β -glucanase and xylanase expressed in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 261, n. 2, p. 224–230, 2006.

MACAULEY-PATRICK, S. et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, v. 22, n. 4, p. 249–270, 2005.

MAROKHÁZI, J. et al. Comparison of Proteolytic Activities Produced by Entomopathogenic Photorhabdus Bacteria: Strain- and Phase-Dependent Heterogeneity in Composition and Activity of Four Enzymes. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 12, p. 7311-7320, 2004.

MARGESIN, R.; ZIMMERBAUER, A.; SCHINNER, F. Soil lipase activity - A useful indicator of oil biodegradation. **Biotechnology Techniques**, v. 13, n. 12, p. 859–863, 1999.

MASE, T.; MATSUMIYA, Y.; AKIBA, T. Purification and characterization of a new lipase from *Fusarium* sp. YM-30. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 59, n. August, p. 1771–1772, 1995.

MATSUMAE, H.; FURUI, M.; SHIBATANI, T. Lipase-catalyzed asymmetric hydrolysis of 3-phenylglycidic acid ester, the key intermediate in the synthesis of diltiazem hydrochloride. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 93–98, 1993.

MCDONALD, K. A. et al. **Heterologous Protein Expression**. Second Edition Elsevier B.V., 2016. v. 1

MEHTA, A.; MEHTA, P. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* under different cultivation conditions. **Folia Microbiologica**, v. 30, p. 42–50, 1985.

- MERHEB-DINI, C. et al. 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, 2009.
- METZGER, J. O.; BORNSCHEUER, U. Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, n. 1, p. 13-22, 2006.
- MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular Proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, n. 3, p. 646–651, 1977.
- MICHIELSE, C. B.; REP, M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 10, n. 3, p. 311–324, 2009.
- MORE, S. S. et al. Purification and properties of a novel fungal alkaline keratinase from *Cunninghamella echinulata*. **Turkish Journal of Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 68–74, 2013.
- MOTHE, T.; SULTANPURAM, V. R. Production, purification and characterization of a thermotolerant alkaline serine protease from a novel species *Bacillus caseinilyticus*. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016.
- NAGAR, M.; DWIVEDI, S. K.; SHRIVASTAVA, D. A review on industrial application in microbial lipases. **International Journal of Pharmaceutical and Research Sciences**, v. 2, p. 631–641, 2013.
- NETO, Y. A. A. H. et al. Determination of specificity and biochemical characteristics of neutral protease isolated from *Myceliophthora thermophila*. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 11, p. 972–82, 2015.
- NG, N. M.; PIKE, R. N.; BOYD, S. E. Subsite cooperativity in protease specificity. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 5-6, p. 401-407, 2009.
- NGUYEN, N. L.; HANOI, V. **Importance of secreted lipases for virulence of the phytopathogenic fungus *Fusarium graminearum***. 110p. Thesis (Doctor rerum naturalium) Department fur Biologie – Universitit Hamburg, 2008.
- NIXON, A. E.; OSTERMEIER, M.; BENKOVIC, S. J. Hybrid enzymes: Manipulating enzyme design. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 6, p. 258-264, 1998.

NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. Detergent-compatible proteases: microbial production, properties, and stain removal analysis. **Prep Biochem Biotechnol**, v. 45, n. 3, p. 233–258, 2015.

NOUT, M. J. R.; AIDOO, K. E. Asian fermented foods. In: ESSER, K.; BENNET, J. W. (Eds.). **The Mycota: a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research - Industrial applications**. 1st. edition. Springer, 2012. p. 23–48.

NOVOZYMES, A. **Enzyme at work**. 4th. ed.p. 1-73, 2013.

NOVOZYMES BIOLOGICALS INC. Kang, Y. et al. **Bacillus amyloliquefaciens strain**. EP2566952 B1, Google Patents, 2016. Disponível em: <https://www.google.com/patents/EP2566952B1?cl=en>

NOZAKI, Y.; REYNOLDS, J. A.; TANFORD, C. The interaction of a cationic detergent with bovine serum albumin and other proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 14, p. 4452–4459, 1974.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 4, p. 695-704, 2007.

OTSUKA, R. et al. Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. **Microbiology and Immunology**, v. 59, n. 1, p. 28–36, 2015.

OTZEN, D. Protein-surfactant interactions: A tale of many states. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1814, n. 5, p. 562–591, 2011.

OTZEN, D. E. Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature. **Biophysical journal**, v. 83, n. 4, p. 2219–30, 2002.

OTZEN, D. E.; SEHGAL, P.; WESTH, P. α -Lactalbumin is unfolded by all classes of surfactants but by different mechanisms. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 329, n. 2, p. 273–283, 2009.

PAGE, M. J.; DI CERA, E. Role of Na⁺ and K⁺ in enzyme function. **Physiological reviews**, v. 86, n. 4, p. 1049–1092, 2006.

- PALMA, J. M. et al. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: Role of peroxisomes. **Plant Physiology and Biochemistry**. V. 40, p. 521-530, 2002
- PANAGIOTOU, G. et al. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 18, n. 1, p. 37–45, 2003.
- PANUTHAI, T. et al. An extracellular lipase from the endophytic fungi *Fusarium oxysporum* isolated from the Thai medicinal plant, *Croton oblongifolius* Roxb. **African Journal of Microbiology Research**, v. 6, n. 11, p. 2622–2638, 2012.
- PARIZA, M. W.; COOK, M. Determining the safety of enzymes used in animal feed. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 332–342, 2010.
- PEKKARINEN, A. I.; JONES, B. L.; NIKU-PAAVOLA, M. L. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 3, p. 798–807, 2002.
- PELE, M.; CIMPEANU, C. Definitions and historical evolution of biotechnology. In: **Biotechnology: An Introduction**. 1st Edition, 2012, p. 1-9.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**. V. 93, n. 1-2, p. 67-80, 1998
- PODSIADLO, P. et al. Furin inhibition by compounds of copper and zinc. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 36219–36227, 2004.
- PRIM, N. et al. Use of methylumbelliferyl-derivative substrates for lipase activity characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 5–6, p. 339–346, 2003.
- QUINTANILLA, D. et al. Fungal morphology in industrial enzyme Production-Modelling and monitoring. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 149, p. 29–54, 2015.
- RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 114-140, 1998.

RAJASEKHAR, A. et al. Thermostable bacterial protease - A new way for quality silk production. **International Journal of Bio-Science and Bio-Technology**, v. 3, n. 4, p. 43–58, 2011.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 62, p. 597–635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; MORTON, F. R.; BARRETT, A. J. An introduction to peptidases and the merops database. In: **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. 2007, p. 161–179.

REDDY, V. A. et al. Chimeric gene construct coding for bi-functional enzyme endowed with endoglucanase and phytase activities. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 2, p. 171–175, 2009.

RIORDAN, J. F. The role of metals in enzyme activity. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 7, n. 2, p. 139-145, 1977.

RIZK, M.; ANTRANIKIAN, G.; ELLEUCHE, S. End-to-end gene fusions and their impact on the production of multifunctional biomass degrading enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 428, n. 1, p. 1–5, 9 nov. 2012.

RIZK, M.; ELLEUCHE, S.; ANTRANIKIAN, G. Generating bifunctional fusion enzymes composed of heat-active endoglucanase (Cel5A) and endoxylanase (XylIT). **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 1, p. 139–145, 2015.

ROBERTS, I. M. Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: A convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. **Lipids**, v. 20, n. 4, p. 243–247, 1985.

ROMDHANE, I. B. BEN et al. A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, n. 1, p. 112–120, 2010.

RUBINGH, D. N. The influence of surfactants on enzyme activity. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 1, n. 5, p. 598–603, 1996.

RUTALA, W. A. et al. **Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities**, 2008.

RYPNIEWSKI, W. R. et al. Fusarium oxysporum trypsin at atomic resolution at 100 and 283 K: A study of ligand binding. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 57, n. 1, p. 8–19, 2001.

SALAMEH, M. A.; WIEGEL, J. Effects of Detergents on Activity, Thermostability and Aggregation of Two Alkalithermophilic Lipases from *Thermosyntropha lipolytica*. **Open Biochem J**, v. 4, p. 22–28, 2010.

SALVI, G.; DE LOS RIOS, P.; VENDRUSCOLO, M. Effective interactions between chaotropic agents and proteins. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 61, n. 3, p. 492–499, 2005.

SARATH G., DE LA MOTTE, R.S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J. . B. J. S. (Ed.). . **Proteolytic enzymes: a practical approach**. Second edi ed. New york: Oxford University, 2001.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 27, n. 2, p. 157–162, 1967.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. In: CREIGTON, T. E. (Ed.). **Protein structure a practical approach**. Second edi ed. New york: Oxford University, 1989. p. 1–19.

SEKHON, A. et al. Production of extracellular lipase by *Bacillus megaterium* AKG-1 in submerged fermentation. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 179–183, 2006.

SHAN, L. et al. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. **The Biochemical journal**, v. 383, n. Pt 2, p. 311–8, 2004.

SHARIFF, F. M. et al. A newly isolated thermostable lipase from *Bacillus* sp. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 5, p. 2917–2934, 2011.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, purification, characterization and applications of lipases. **Biotechnology advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic solvent tolerant lipases and applications. **The**

Scientific World Journal, p. 1-15, 2014.

SHU, C. H.; XU, C. J.; LIN, G. C. Purification and partial characterization of a lipase from *Antrodia cinnamomea*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 734–738, 2006.

SIEZEN, R. J.; LEUNISSEN, J. A. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. **Protein science : a publication of the Protein Society**, v. 6, n. 3, p. 501–23, 1997.

SIM, Y. C. et al. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 2, p. 137–140, 2000.

SINGH, A.; KUMAR, P. K. R. *Fusarium oxysporum*: Status in Bioethanol Production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 129–147, 1991.

SINGH, R.; WHITESIDES, G. M. Reagents for rapid reduction of disulfide bonds in proteins. **Techniques in Protein Chemistry**, v. 6, n. C, p. 259–266, 1995.

SINHA, S.; SINHA, S. Studies on the Production of Acid Protease by Submerged Fermentation. **International Journal of Food Engineering**, v. 5, n. 1, 2009.

SOBERANES-GUTIÉRREZ, C. V. et al. The pep4 gene encoding proteinase A is involved in dimorphism and pathogenesis of *Ustilago maydis*. **Molecular Plant Pathology**, v. 16, n. 8, p. 837–846, 2015.

STAUFFER, C. E.; TREPTOW, R. S. Inactivation of subtilisin Carlsberg in surfactant and salt solutions. **BBA - Protein Structure**, v. 295, n. 2, p. 457–466, 1973.

SUKHOSYROVA, E. A. et al. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by dueteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447–451, 2003.

TAN, C. H. et al. Novel lipase purification methods - a review of the latest developments. **Biotechnology Journal**, v. 10, n. 1, p. 31-40, 2015.

TAN, T. et al. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1495–1502, 2004.

TEN HAVE, A. et al. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis

of fungal plant pathogens. **The Mycota**, v. 11, p. 341–358, 2002.

THANIKAIVELAN, P. et al. **Progress and recent trends in biotechnological methods for leather processing** *Trends in Biotechnology*, 2004.

THEBTI, W.; RIAHI, Y.; BELHADJ, O. Purification and Characterization of a New Thermostable, Haloalkaline, Solvent Stable, and Detergent Compatible Serine Protease from *Geobacillus toebii* Strain LBT 77. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.

THYS, R. C. S. et al. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. in feather meal using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 1, p. 67–73, 2006.

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. et al. Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: Purification, characterization, gene cloning, and heterologous expression. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 162–169, 2003.

UEDA, M. et al. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 331–338, 2007.

VERMELHO, A. B. et al. Diversity and biotechnological applications of prokaryotic enzymes. In: **The Prokaryotes: Applied Bacteriology and Biotechnology**. 2013. p. 213–240.

VERMELHO, A. B. et al. Application of microbial enzymes in food industry. In: RAVISHANKAR, R. V (Ed.). **Advances in Food Biotechnology**. 1st. ed. Oxford: John Wiley & Sons, 2016. p. 103–132.

WANG, J. et al. Purification and characterization of a new metallo-neutral protease for beer brewing from *Bacillus amyloliquefaciens* SYB-001. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 8, p. 2021–2033, 2013.

World Enzymes - Demand and Sales Forecasts, Market Share, Market Size, Market Leaders. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>>.

WU, B. et al. Purification and characterization of a novel fibrinolytic protease from *Fusarium* sp. CPCC 480097. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 3, p. 451–459, 2009.

YADAV, N.; SARKAR, S. Production of L-asparaginase By *Fusarium oxysporum* using submerged fermentation. **International Journal of Pharmaceutical Science Invention**, v. 3, n. 6, p. 32–40, 2014.

YANG, W. et al. A new extracellular thermo-solvent-stable lipase from *Burkholderia ubonensis* SL-4: Identification, characterization and application for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 76–89, 2016.

YOURNO, J.; KOHNO, T.; ROTH, J. R. Enzyme evolution: generation of a bifunctional enzyme by fusion of adjacent genes. **Nature**, v. 225, p. 563–564, 1970.

YU, M.; QIN, S.; TAN, T. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 384–391, 2007.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137–2143, 2011.

ZHENG, Y. Y. et al. Thermophilic lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Gene cloning, expression and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 3–4, p. 127–132, 2011.

APÊNDICES

Tabela 12 . Sumário das características das enzimas purificadas no trabalho.

Enzima	<i>Lipase</i>	<i>Peptidase</i>	<i>Peptidase_quimera</i>
pH ótimo	10,0	7,0	6,0
Temperatura ótima	35 °C	50 °C	55 °C
Estabilidade – pH	7,0-7,5	3,0-10,0	4,0-9,0
Estabilidade - Temperatura	25-40°C*	45-60°C*	30-45 °C
Inibidores	-	PMSF	PMSF/EDTA
Íons	Na ⁺ - S.I.** Restante – M.N.***	Mn ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Ba ²⁺ - M.P.**** Na ⁺ , K ⁺ , Al ³⁺ , Li ⁺ - S.I. Co ²⁺ , Cu ²⁺ - M.N.	1mM Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Li ⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ - M.P. Na ⁺ , K ⁺ , Al ³⁺ - S.I. Co ²⁺ , Cu ²⁺ - M.N. 5mM Ca ²⁺ , Ba ²⁺ , Mg ²⁺ , Mn ²⁺ Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ - M.P. Al ³⁺ - S.I. Co ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ - M.N.
Surfactantes	<i>SDS</i> 0,01%~10% / S/A***** <i>Triton x-100</i> 0,01-0,5%~60/30/10% <i>Tween 80</i> 0,01-0,5%~30/30/15% <i>CTAB</i> 0,01-0,5%20 a 10%	0,01-0,05%~80% / 0,1%10% ~80% 0,01-0,05% S.I. / 0,1-1%70-60% S.I.	0,01% S.I. / 0,05 -0,1%~50-25% 0,01-0,5% S.I. / 1%~190% 0,01-0,1% S.I. / 0,5-1%25-10% 0,01%~70% / 0,1-0,5%<10%
Agentes caotrópicos	<i>DTT</i> S/A <i>Cloridrato de guanidina</i> 10, 50, 100mM70 a 50% <i>Ureia</i> 10, 50, 100mM 50 a 100%	90 a 70% 10, 50mM 120% / 100mM S.I. 10, 50mM S.I. / 100mM ~70%	10,25, 50mM190 a 120% / 100, 200mM~60/50% 20 a 50% 10,25, 50mM~40 a 30% / 100mM S/A

*pelo menos 50% da atividade até 60 minutos/ **S.I. – sem influência/ ***M.N. – modulação negativa / ****M.P. – modulação positiva/ *****S/A – sem atividade

Tabela 13. Valores numéricos da cinética dos subsítios S₁, S₂ e S₃.

	Abz-KLXSSKQ-Eddnp			Abz-KXRSSKQ-Eddnp			Abz-XLRSSKQ-Eddnp		
	K_m (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (X 10 ⁻³ s ⁻¹ mM ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (X 10 ⁻³ s ⁻¹ mM ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (X 10 ⁻³ s ⁻¹ mM ⁻¹)
A	0,0015 ± 0,0006	35,75 ± 1,73	24,063 ± 2,77	0,0028 ± 0,0007	17,46 ± 4,67	6,249 ± 0,523	0,0039 ± 0,0007	10,31 ± 1,65	2,672 ± 0
D	0	0	0	0	0	0	0,0012 ± 0,0002	3,26 ± 1,48	2,738 ± 0,583
E	0,0207 ± 0,003	47,21 ± 5,53	22,858 ± 0,71	0,0025 ± 0,001	5,95 ± 1,60	2,407 ± 0	0,0035 ± 0	16,47 ± 0	4,726 ± 0
F	0,0004 ± 0,00004	19,44 ± 2,18	51,107 ± 1,05	0,0006 ± 0,00005	9,85 ± 0,68	15,627 ± 0,535	0,0023 ± 0,0006	16,07 ± 2,80	7,088 ± 0,613
G	Não existente			0,0115 ± 0,001	8,81 ± 0,96	0,766 ± 0,116	Não existente		
H	0,0012 ± 0,0002	29,75 ± 2,31	24,037 ± 2,43	0	0	0	0,0028 ± 0,0007	24,75 ± 4,60	8,951 ± 0,801
I	0	0	0	0,0003 ± 0,00004	6,05 ± 0,55	20,256 ± 3,174	0,0031 ± 0,0002	19,29 ± 3,21	6,273 ± 0,684
K	0,0006 ± 0,00009	53,01 ± 1,17	86,022 ± 3,96	0	0	0	Não existente		
L	0,0014 ± 0,00002	22,50 ± 0,23	16,105 ± 1,43	Não existente			0,0016 ± 0,0004	7,81 ± 1,28	5,021 ± 1,538
M	0,0013 ± 0,0002	24,53 ± 0,42	18,898 ± 3,34	0,0027 ± 0,001	5,74 ± 1,66	2,160 ± 0	0,00032 ± 0,0001	12,03 ± 0,46	38,236 ± 1,203
N	0,0046 ± 0,001	32,33 ± 0,80	6,954 ± 0,32	Não existente			0,0022 ± 0,0007	9,85 ± 2,23	4,509 ± 0,973
P	0	0	0	0,0056 ± 0,0013	6,06 ± 1,13	1,086 ± 0,050	Não existente		
Q	0,0009 ± 0,0001	24,68 ± 1,58	27,293 ± 2,21	0,0026 ± 0,0009	4,46 ± 1,48	1,699 ± 0,290	0,0008 ± 0,0002	8,60 ± 2,09	10,812 ± 1,142
R	0,0041 ± 0,0007	62,58 ± 2,59	15,426 ± 3,43	0,0046 ± 0,0004	3,54 ± 1,06	0,765 ± 0,155	Não existente		
S	0,0012 ± 0,0002	29,24 ± 2,59	24,575 ± 3,34	0,0023 ± 0,0004	6,40 ± 0,71	2,725 ± 0,222	0,0012 ± 0,00005	11,17 ± 0,22	9,244 ± 0,182
T	0,0027 ± 0,0001	35,66 ± 1,79	13,256 ± 0,075	0,0018 ± 0,0002	1,48 ± 0,11	0,837 ± 0,096	0,0011 ± 0,0004	18,07 ± 2,54	16,023 ± 0,866
V	0,0063 ± 0,0013	12,20 ± 0,96	1,922 ± 0,033	0,0016 ± 0,0002	6,55 ± 0,95	4,197 ± 0,693	0,0019 ± 0,0006	7,66 ± 1,12	4,062 ± 2,203
W	0,0012 ± 0,00005	7,28 ± 0,85	6,131 ± 0,746	0	0	0	0,0020 ± 0,0005	3,80 ± 0,23	1,921 ± 0,406
Y	0,0016 ± 0,0002	50,20 ± 4,13	31,445 ± 2,143	0,0026 ± 0,0005	2,95 ± 0,74	1,117 ± 0	0,0012 ± 0,0004	19,99 ± 3,02	17,479 ± 8,025

Tabela 14. Valores numéricos da cinética dos subsítios S'₁, S'₂ e S'₃.

	Abz-KLRXSKQ-Eddnp			Abz-KLRSXKQ-Eddnp			Abz-KLRSSXQ-Eddnp		
	$K_m (\mu\text{M})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$K_m (\text{mM})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)	$K_m (\text{mM})$	$k_{cat} (\text{s}^{-1})$	k_{cat}/K_m ($\times 10^{-3} \text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$)
A	$0,0058 \pm 0,0011$	$15,05 \pm 4,45$	$2,612 \pm 0,373$	$0,0011 \pm 0,00037$	$31,47 \pm 3,93$	$27,726 \pm 2,477$	$0,0003 \pm 0,00003$	$20,84 \pm 1,58$	$67,207 \pm 5,874$
D	0	0	0	$0,0052 \pm 0,0014$	$8,01 \pm 1,8$	$1,544 \pm 0,089$	$0,0037 \pm 0,0015$	$19,26 \pm 4,09$	$5,193 \pm 1,151$
E	0	0	0	$0,0105 \pm 0,0032$	$20,74 \pm 4,41$	$1,97 \pm 0,213$	$0,0014 \pm 0,00007$	$11,71 \pm 0,92$	$8,476 \pm 0,215$
F	$0,0007 \pm 0,00001$	$7,04 \pm 0,84$	$9,486 \pm 0,932$	$0,001 \pm 0,00013$	$13,94 \pm 0,18$	$14,473 \pm 1,954$	$0,0019 \pm 0,0004$	$14,68 \pm 2,17$	$7,649 \pm 0,555$
G	$0,0008 \pm 0,0001$	$5,07 \pm 0,25$	$6,139 \pm 1,147$	$0,0041 \pm 0,00051$	$18,56 \pm 6,42$	$4,477 \pm 0,298$	$0,0025 \pm 0,00018$	$20,48 \pm 2,36$	$8,166 \pm 0,662$
H	$0,0050 \pm 0,0004$	$25,87 \pm 1,49$	$5,270 \pm 0,225$	$0,0034 \pm 0,0010$	$34,09 \pm 6,22$	$10,028 \pm 1,493$	$0,0049 \pm 0,0008$	$20,73 \pm 6,03$	$4,195 \pm 0,380$
I	$0,0002 \pm 0,00002$	$13,55 \pm 0,51$	$63,770 \pm 5,569$	$0,0014 \pm 0,00038$	$7,14 \pm 0,45$	$4,999 \pm 1,054$	$0,0016 \pm 0,0005$	$5,98 \pm 1,53$	$3,777 \pm 0,482$
K	$0,0026 \pm 0,0003$	$4,31 \pm 0,45$	$1,675 \pm 0,057$	$0,0027 \pm 0,0006$	$17,28 \pm 2,18$	$6,356 \pm 0,925$	$0,0033 \pm 0,0006$	$29,42 \pm 3,17$	$8,778 \pm 0,780$
L	$0,0002 \pm 0,00005$	$9,33 \pm 0,30$	$51,367 \pm 2,911$	$0,001 \pm 0,00015$	$12,39 \pm 0,55$	$12,545 \pm 1,688$	$0,0011 \pm 0,00005$	$4,43 \pm 0,31$	$3,827 \pm 0,297$
M	$0,0005 \pm 0,00007$	$13,77 \pm 2,71$	$26,865 \pm 1,573$	$0,0018 \pm 0,0004$	$21,49 \pm 3,11$	$11,608 \pm 1,386$	$0,0014 \pm 0,0002$	$10,3 \pm 0,99$	$7,111 \pm 0,919$
N	Não existente			$0,0041 \pm 0,0012$	$18,59 \pm 3,88$	$4,527 \pm 0,472$	$0,0019 \pm 0,0003$	$12,1 \pm 0,8$	$6,324 \pm 1,098$
P	0	0	0	$0,0039 \pm 0,00003$	$11,62 \pm 0,61$	$2,981 \pm 0,129$	$0,0032 \pm 0,0006$	$17,79 \pm 2,2$	$5,548 \pm 1,108$
Q	$0,0115 \pm 0$	$30,28 \pm 0$	$2,624 \pm 0$	$0,0017 \pm 0,0009$	$4,63 \pm 0,35$	$2,699 \pm 0,309$	$0,0028 \pm 0,0004$	$12,85 \pm 1,5$	$4,81 \pm 0,435$
R	$0,0021 \pm 0,0008$	$3,48 \pm 1,13$	$1,688 \pm 0,325$	$0,0066 \pm 0,0001$	$32,63 \pm 2,40$	$4,941 \pm 0,289$	$0,0004 \pm 0,0001$	$11,81 \pm 0,55$	$27,128 \pm 1,199$
S	Não existente			Não existente			$0,0044 \pm 0,0005$	$23,17 \pm 1,66$	$5,234 \pm 0,825$
T	$0,0007 \pm 0,00002$	$8,81 \pm 0,27$	$12,606 \pm 0,237$	$0,0017 \pm 0,0003$	$27,96 \pm 2,41$	$16,314 \pm 1,636$	$0,0022 \pm 0,0004$	$6,18 \pm 0,58$	$2,744 \pm 0,377$
V	$0,0004 \pm 0,00001$	$4,49 \pm 0,97$	$11,208 \pm 2,583$	$0,0011 \pm 0,00019$	$9,76 \pm 0,59$	$8,895 \pm 1,134$	$0,0019 \pm 0,0002$	$10,61 \pm 0,05$	$5,665 \pm 0,758$
W	$0,0027 \pm 0,0004$	$46,03 \pm 4,05$	$16,778 \pm 1,260$	$0,0094 \pm 0,0013$	$96,38 \pm 12,69$	$10,215 \pm 0,069$	$0,0032 \pm 0,001$	$19,74 \pm 4,79$	$6,218 \pm 1,310$
Y	$0,0006 \pm 0,00009$	$28,56 \pm 1,57$	$44,619 \pm 4,306$	$0,0009 \pm 0,00006$	$16,12 \pm 0,99$	$18,501 \pm 2,358$	$0,0026 \pm 0,0008$	$23,22 \pm 4,83$	$8,813 \pm 0,625$

Figura 53. Efeito do pH na atividade enzimática da lipase pertencente à enzima bifuncional Quim_LP utilizando substrato 4-metilumbeliferil butirato.

Figura 54. Efeito da temperatura na atividade enzimática da lipase pertencente à enzima bifuncional Quim_LP utilizando substrato 4-metilumbeliferil butirato.