UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da
peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.**

Gabriel Tescarolo Giovanini

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da
peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.**

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientado: Gabriel Tescarolo Giovanini

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/05/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

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

Gabriel Tescarolo Giovanini

Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.

57 p., 30 cm

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

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia 2. Enzimologia 3. Liofilização

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Tescarolo Giovanini

Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.

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

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho a minha mãe,
“Maria Teresa (in memoriam) que
Me deu a luz, me trouxe a paz, me deu o mundo
Eu te adoro desde o primeiro segundo
É pai e mãe
É o meu chão, melhor amiga
Só sei que sou grato por tudo
Mãe querida
Vai durar mais de uma vida
Se eu começar agradecer
És o meu anjo
Eu vou te amar por toda a vida”*

Mamãe querida

Agradecimentos

Aos meus pais que sempre acreditaram em mim e deram muito amor e incentivo em minha caminhada assim como todos da minha família pelos momentos alegres proporcionados.

A minha namorada Ana Claudia pelo amor, incentivo, ajuda e companheirismo em todos os momentos sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Hamilton Cabral que tenho muito respeito, agradeço pela orientação, conselhos e amizade nos momentos que passamos juntos em minha vida acadêmica e fora dela.

A Nathalia pelo apoio, confiança, amizade e incentivo durante a minha vida acadêmica e fora dela.

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

Aos amigos Youssef, Ronivaldo, Ana Claudia, Andrezza, Lute, Carlão, Luã e Vitão que estiveram ao meu lado, independente do momento.

A todos os professores do curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela colaboração e ensinamentos.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

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

MUITO OBRIGADO A TODOS POR ME APOIAREM NESSA CAMINHADA!!!

Gabriel Giovanini

Resumo

Giovanini, G. T. Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*. 2014. 57p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Peptidase pode ser considerada, como uma subclasse das enzimas hidrolíticas que ocupam uma posição central em relação às suas aplicações na área fisiológica e também na área comercial. As peptidases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais e são responsáveis por cerca de 60% da venda mundial de enzimas. O presente trabalho visa avaliar a produção de peptidase em fermentação submersa (FSm) pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, utilizando como substrato farinha de pena (FP), a caracterização bioquímica parcial, secagem do extrato bruto, purificação da peptidase e determinação de especificidade da peptidase isolada. Para avaliar a influência da farinha de pena (FP), na produção de peptidases, foram adicionadas às porcentagens de 0,2; 0,4 e 0,8% no meio de cultura. Os melhores níveis de produção de peptidases pelo fungo *Scopulariopsis koningii* foram obtidos nas concentrações de 0,4% e 0,8% de FP em 48h de fermentação com 1.427 U/mL. A caracterização bioquímica parcial do extrato bruto foi realizada com azocaseína 1% preparada em tampão com pH adequado. A peptidase presente no extrato enzimático apresentou atividade ótima em pH 6,5 e temperatura ótima de 55°C. A peptidase foi inibida por PMSF, indicando a presença de resíduo de aminoácido serino no sítio catalítico, e desta forma sendo classificada como serino peptidase. Entretanto, também observamos uma inibição por EDTA, sugerindo a presença de uma metalo peptidase presente no extrato bruto, desta forma podemos sugerir que o fungo *S. koningii* na presença do meio contendo FP secreta duas subclasses; serino e metalo peptidase, ou secreta uma serino peptidase dependente de íon. Zimograma constatou a presença de duas enzimas. A atividade enzimática do extrato bruto diminuiu significativamente quando exposta os íons Al^{3+} , Ni^{2+} e Cu^{2+} e aumentada quando adicionados os íons Ba^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} . A purificação da metalo peptidase presente no extrato enzimático envolveu sete etapas de purificação, sendo cromatografia de troca-iônica e gel filtração determinantes, com recuperação de 6% e purificação de 3,4 vezes. Utilizando a peptidase pura (metalo) realizou-se a caracterização bioquímica funcional e a determinação dos parâmetros cinéticos, ambos utilizando o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência. A peptidase pura apresentou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura ótima de 40°C e mostrou-se estável em ampla faixa de pH e temperatura. Foi modulada positivamente pelos íons Na^{+} e K^{+} e negativamente por Al^{3+} e Cu^{2+} . A análise dos parâmetros cinéticos revelou uma grande influência de aminoácidos apolares do lado “linha” do substrato sintético na eficiência catalítica e no lado não “linha” grande influência de aminoácidos polares neutros e apolares. A secagem foi realizada por liofilização foram utilizados três tipos de adjuvantes: maltodextrina, manitol e glicina, em diferentes concentrações. Após a secagem foi realizado estudo da estabilidade nas temperaturas 4, 25 e 60°C por 32 dias para avaliar o desempenho dos adjuvantes na manutenção da atividade do extrato enzimático liofilizado. O adjuvante considerado mais eficaz foi a maltodextrina na concentração de 4,5% que manteve cerca de 93% da atividade do extrato enzimático liofilizado por 32 dias.

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

Abstract

Giovanini, G. T. Production, freeze drying, purification and determination of specific peptidase isolated from the fungus *Scopulariopsis koningii*. 2014. 57p. Thesis (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Peptidase can be considered as a subclass of hydrolytic enzymes which occupy a central position in relation to their applications in physiological area and also in the commercial area. Peptidases represent one of the three largest groups of industrial enzymes and account for about 60% of worldwide sales of enzymes. This study aims to evaluate the production of peptidase in submerged fermentation (FSm) by the fungus *Scopulariopsis koningii*, using as substrate feather meal (FP), the partial biochemical characterization, drying the crude extract, purification and determination of specific peptidase isolated. To evaluate the influence of feather meal (FM), in the production of peptidases, were added to the percentages of 0.2, 0.4 and 0.8% in the culture medium. The best levels of production of peptidases by the fungus *Scopulariopsis koningii* were obtained at concentrations of 0.4% and 0.8% of FP 48h fermentation with 1,427 U/mL. Partial biochemical characterization of the crude extract was performed with 1% azocasein prepared in buffer with appropriate pH. This in peptidase enzyme extract showed optimal activity at pH 6.5 and optimum temperature of 55°C. The peptidase was inhibited by PMSF, indicating the presence of a serine residue at amino acid catalytic site, and thus being classified as serine peptidase. However, we also observed an inhibition by EDTA, suggesting the presence of a metallo peptidase present in the crude extract, thus we suggest that the fungus *S. koningii* in the presence of medium containing secret FP two subclasses; serine peptidase and metal, or secretes a serine peptidase dependent ion. Zymogram found the presence of two enzymes. The enzymatic activity of the crude extract decreased significantly when exposed the Al^{3+} , Ni^{2+} and Cu^{2+} ions and increased when added to Ba^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} ions. The purification of metallo peptidase present in the enzyme extract involved seven stages of purification, and ion-exchange chromatography and gel filtration determinants, with recovery and purification of 6 % from 3.4 times. Using pure peptidase (metallo) held functional biochemical characterization and determination of kinetic parameters using both the intramolecular peptide substrate fluorescence suppression. Pure peptidase showed optimal activity at pH 6.0 and optimum temperature of 40°C and was stable in a wide range of pH and temperature. The positively modulated by Na^+ and K^+ and negatively by Al^{3+} and Cu^{2+} . Analysis of kinetic parameters revealed a strong influence of nonpolar amino acid side “line” of the synthetic substrate in the catalytic efficiency and not on the side “line” great influence of nonpolar and polar neutral amino acids. The freeze drying was performed by three types of additives were used: maltodextrin, mannitol and glycine in different concentrations. After drying stability study was conducted at the temperatures 4, 25 and 60°C for 32 days to evaluate the performance of additives in maintaining the activity of the enzyme extract lyophilized. The adjuvant was found more efficacious maltodextrin in a concentration of 4.5%, which retained about 93% of the extract lyophilized enzyme activity for 32 days.

Keywords : biotechnology, enzymology , lyophilization , peptidase , bioprocesses .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Scopulariopsis sp.</i> .	07
Figura 2. Panorama geral das etapas do estudo e a sequência de como foi conduzido.	11
Figura 3. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).	17
Figura 4. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999).	19
Figura 5. Influência de fontes de carbono na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo <i>S.koningii</i> para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm.	22
Figura 6. Influência de fontes de nitrogênio na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo <i>S.koningii</i> para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm.	23
Figura 7. Influência de farinha de pena como substrato na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo <i>S.koningii</i> para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm.	23
Figura 8. Influência da concentração de esporos na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo <i>S.koningii</i> para a produção de peptidase em pH 6,0 e meio suplementado com 0,4% de farinha de pena, incubado a 30°C e 120 rpm.	24
Figura 9A. Determinação das melhores condições de meio para fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> para produção de peptidase suplementado com 0,4% de farinha de pena e 120 rpm - Influência de pH incubado a 30°C	25
Figura 9B. : Determinação das melhores condições de meio para fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> para produção de peptidase suplementado com 0,4% de farinha de pena e 120 rpm - Influência Temperatura em pH 6,0.	25
Figura 10. Determinação do pH ótimo do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> utilizando azocaseína como substrato.	26
Figura 11. Determinação da temperatura ótima do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> utilizando azocaseína como substrato.	27
Figura 12A. Influência de íons na atividade enzimática do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 6,5 incubado a 55°C.	27
Figura 12B. Zimograma em gel SDS-PAGE 12% com adição de gelatina (3mg/mL) para verificação de atividade proteolítica <i>in situ</i> .	27
Figura 13. Influência de inibidores na atividade enzimática do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo <i>S. koningii</i> com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 6,5 incubado a 55°C.	28

- Figura 14.** Perfil de eluição das proteínas contidas no extrato bruto concentrado, utilizando a resina source Q. 30
- Figura 15.** Gel de eletroforese desnaturante SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata, das frações eluídas da cromatografia de troca-iônica. 31
- Figura 16.** Perfil de eluição das proteínas contidas no concentrado da cromatografia de troca-iônica, utilizando resina Superdex-75 31
- Figura 17.** Gel de eletroforese desnaturante SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata das etapas de produção e purificação da peptidase obtida do fungo *S. koningii*. 32
- Figura 18.** Efeito do pH sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *S. koningii*. 33
- Figura 19.** Efeito da temperatura sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *S. koningii*. 34
- Figura 20.** Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Scopulariopsis koningii*, frente à exposição a diferentes valores de pH 34
- Figura 21.** Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Scopulariopsis koningii*, frente à exposição a diferentes valores de temperatura. 35
- Figura 22A.** Influência de diferentes concentrações dos surfactantes CTAB, Tween, Triton e SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *S. koningii*. 37
- Figura 22B.** Influência de diferentes concentrações do surfactante SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *S. koningii*. 37
- Figura 23.** Estabilidade do extrato bruto concentrado liofilizado, armazenado a 4°C, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii*. 43
- Figura 24.** Estabilidade do extrato bruto concentrado liofilizado, armazenado a 25°C, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii*. 44
- Figura 25.** Estabilidade do extrato bruto concentrado liofilizado, armazenado a 60°C, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii*. 45
- Figura 26:** Rendimento da liofilização do extrato bruto obtido no bioprocesso submerso pelo fungo *S. koningii*. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fontes de obtenção de peptidases e aplicações industriais	06
Tabela 2. Etapas de purificação da peptidase, produzida em bioprocessamento submerso, pelo fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> .	29
Tabela 3. Efeito de íons sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocessamento fermentativo submerso do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> .	36
Tabela 4. Efeito de inibidores sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocessamento fermentativo submerso do fungo <i>S. koningii</i> .	36
Tabela 5. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_1 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_1 .	38
Tabela 6. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_2 .	39
Tabela 7. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_3 .	39
Tabela 8. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_1 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_1 .	40
Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_2 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_2 .	41
Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo <i>Scopulariopsis koningii</i> do subsítio S_3 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P_3 .	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Alanina (Ala)
Ad	Adjuvante
AIA	Ácido iodoacético
BSM	Bioprocesso submerso
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
D	Aspartato (Asp)
E	Ácido glutâmico (Glu)
EB	Extrato bruto
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
F	Fenilalanina (Phe)
FP	Farinha de Pena
FRET	Transferência de energia de ressonância de fluorescência
G	Glicina (Gly)
H	Histidina (His)
I	Isoleucina (Ile)
K	Lisina (Lys)
L	Leucina (Leu)
M	Metionina (Met)
N	Asparagina (Asn)
P	Prolina (Pro)
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsufonila
Q	Glutamina (Gln)
R	Arginina (Arg)
S	Serina (Ser)
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T	Treonina (Thr)
TCA	Ácido tricloroacético
UFPE	Universidade Federal do Pernambuco
V	Valina (Val)
VA	Vação de alimentação
W	Triptofano (Trp)
Y	Tirosina (Tyr)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Enzimas	01
1.2 Peptidases	02
1.3 Funções fisiológicas das peptidases	04
1.4 Aplicações biotecnológicas de peptidases	05
1.5 Bioprocesso submerso	06
1.6 <i>Scopulariopsis koningii</i> (Oudem.) Vuill. 1911	07
1.7 Liofilização	08
2.OBJETIVOS	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Isolamento, identificação e manutenção do micro-organismo	11
3.2 Preparo do inóculo	11
3.3 Bioprocesso em meio submerso	12
3.4 Sistema de ultrafiltração tangencial	13
3.5 Purificação	13
3.5.1 Cromatografia	13
3.5.2 Determinação de proteínas totais	14
3.5.3 Avaliação do grau de pureza, tamanho da peptidase e zimograma	14
3.6 Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína	15
3.7 Avaliação da atividade proteolítica com substrato Azocaseína	15
3.8 Caracterização bioquímica parcial dos extratos dos bioprocessos submerso e sólido	16
3.8.1 Efeito de pH e Temperatura	16
3.8.2 Efeito de íons e inibidores	16
3.9 Ensaio de caracterização bioquímica funcional	16
3.9.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência	16
3.9.2 Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional utilizando os substratos FRET	17
3.9.3 Efeito de pH e temperatura	17
3.9.4 Efeito de íons e inibidores	18
3.10 Estudos de cinética enzimática	19
3.10.1 Determinação da concentração molar da enzima purificada	19
3.10.2 Ensaios cinéticos com substrato sintético	19
3.11 Liofilização	20
3.11.1 Estabilidade das micropartículas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	21
4.1 Bioprocesso submerso	21
4.2 Caracterização bioquímica parcial do extrato do bioprocesso submerso	25

4.2.1 Efeito do pH sobre a atividade enzimática	25
4.2.2 Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática	26
4.2.3 Classificação das peptidases	27
4.2.4 Efeito de íons sobre a atividade enzimática	28
4.3 Purificação	29
4.4 Ensaios de caracterização bioquímica funcional	32
4.5 Estudos de cinética enzimática	37
4.6 Liofilização	42
 5. CONCLUSÕES	 47
 6. REFERÊNCIAS	 49

1. INTRODUÇÃO

1.1. Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (LEHNINGER et al., 1995).

Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidorreduases (catalisam reações de oxidoreduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerases (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (HARTMEIER, 1988). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo α -hélice ou folha β . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que promove torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

As enzimas são utilizadas na biologia molecular e na biomedicina (EL TAYAR et al., 1991), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (ITO et al., 1990). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003; COLLEN, 2006).

A produção de enzimas é uma área da Biotecnologia em expansão, que movimenta bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Novas enzimas e usos estão sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. E são decrescentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

1.2. Peptidases

Enzimas proteolíticas, proteases, proteinases ou peptidases são formas utilizadas, porém este último termo é o recomendado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Essas enzimas catalisam a quebra das ligações peptídicas de proteínas e são largamente distribuídas em todas as plantas, animais e micro-organismos. Em organismos superiores, cerca de 2% dos genes codificam essas enzimas (MAHAJAN e BADGUJAR, 2010).

A clivagem de ligações peptídicas é uma das mais frequentes e importantes modificações que ocorrem em proteínas. Historicamente, a proteólise enzimática foi associada com a digestão de proteínas e chamou a atenção de fisiologistas e bioquímicos, interessados neste processo em animais, inclusive no homem. Assim, as peptidases digestivas que constituem as secreções gástricas e pancreáticas são as enzimas mais bem caracterizadas, gerando o conhecimento atual sobre as estruturas e funções das enzimas proteolíticas em geral.

Investigações das propriedades cinéticas, especificidade e inibição, associadas com análises detalhadas de suas estruturas por cristalografia de raios x e de suas sequências de aminoácidos, levaram à identificação dos componentes e da geometria dos sítios ativos de peptidases, permitindo a dedução de seus mecanismos de ação. Como resultado, tornou-se evidente que as peptidases podem ser classificadas em famílias e que membros de uma mesma família apresentam estruturas e mecanismos de ação similares (NEURATH, 1990).

Importantes, também, no campo comercial, além do fisiológico, as peptidases representam 60 % do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, nas áreas de alimentação e de detergentes (GODFREY e WEST, 1996).

As peptidases são classificadas como subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases,

dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal e no interior da molécula, respectivamente (VERMELHO et al., 2008; THYS, 2004; MENDONÇA, 2008; GIONGO, 2006).

Muitas classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, sendo quatro classes consideradas mais comuns: serino, cisteíno, aspártico e metalo peptidases. (RAWLINGS E BARRETT, 1993). As serino peptidases incluem duas famílias distintas: as serino peptidases de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastase) e a peptidase bacteriana subtilisina. Diferem entre si na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, embora tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum. Analogamente, as metalo peptidases incluem duas famílias: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos e a termolisina bacteriana, que diferem uma da outra na estrutura química, embora ambas tenham zinco em seu sítio ativo (KRAUT, 1977).

A família de peptidase mais bem caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino peptidases, exemplificada pelas enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína. A marca de seus sítios ativos é a tríade catalítica asparagina (Asp), histidina (His) e serina (Ser). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977). A conformação global das serino peptidases é praticamente a mesma: dois domínios compactos, simetricamente dispostos ao redor de dois eixos de simetria. Diferenças na especificidade do substrato podem estar relacionadas à substituição de aminoácidos no sítio primário do substrato, comumente denominado de P1, e a diferenças menores, no sítio secundário (CRAIK et al., 1982).

As cisteíno peptidases incluem várias catépsinas de mamíferos, as peptidases ativadas pelo cálcio citossólico (calpaínas) e a papaína e a actinidina de plantas, sendo as papaínas as mais estudadas dessa família. O principal resíduo de aminoácido catalítico é a cisteína (Cys). A catálise ocorre via um éster tiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico (BODE e HUBER, 1992).

As peptidases aspárticas incluem a penicilopepsina bacteriana (que serve como um modelo), a pepsina de mamíferos, a renina, a quimosina e certas peptidases fúngicas. O resíduo ativo característico é o ácido aspártico (NEURATH, 1990).

As metalo peptidases, carboxipeptidases A e B são exopeptidases homólogas, em estrutura e sítio ativo. A carboxipeptidase A prefere o carbono aromático terminal e cadeias alifáticas de natureza hidrofóbica, enquanto a carboxipeptidase B atua diretamente sobre os resíduos básicos de arginina e lisina. A carboxipeptidase A é uma das mais investigadas quanto à cinética, métodos espectroscópicos e cristalográficos de análise. O sítio ativo inclui

zinco, o qual é ligado a dois ácidos glutâmicos e a uma histidina. A termotilisina bacteriana é a única representante das metalo endopeptidases de estrutura e mecanismo de ação bem definidos. Seu sítio ativo é relacionado àquele das metalo carboxipeptidases (NEURATH, 1990).

As peptidases provenientes de microrganismos são preferidas em relação às aquelas de plantas e de animais, do ponto de vista científico e comercial, por ser fonte de rápido crescimento, requerer espaço limitado para cultivo, além de ser de fácil manipulação genética (WARD, 1983).

Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* é o mais estudado quanto à produção de peptidases, especialmente a subtilisina de *B. subtilis*. Quanto aos vírus, estes expressam serino, cisteíno e peptidases aspárticas, cuja importância funcional é o envolvimento no processamento de proteínas da cápsula viral, as quais podem estar relacionadas ao câncer e à Aids (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

Os fungos são, de maneira geral, capazes de produzir a maior variedade de peptidases entre os microrganismos. Entre os fitopatogênicos, muitos produzem peptidases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA e MOSOLOV, 2004). A primeira peptidase extracelular obtida de um fitopatógeno, em sua forma pura, foi uma de 25 KDa, isolada de *Colletotrichum lindemuthianum*, em 1973 (RIES e ALBERSHEIM, 1973).

1.3. Funções fisiológicas das peptidases

As peptidases participam de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles o processo de inflamação, catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, crescimento de tumores e metástases, transporte e secreção de proteínas na membrana celular. São também responsáveis por um mecanismo complexo que envolve a fisiologia normal das células e as condições patológicas anormais. Isto faz com que peptidases sejam alvos para desenvolvimento de agentes terapêuticos para algumas doenças como a AIDS, ou ainda serem utilizadas em indústrias alimentícias e de detergentes (THYS, 2004).

Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias é visível em todos os organismos vivos. De maneira geral as peptidases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para permitir absorção das células e as peptidases intracelulares possuem papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998; MENDONÇA, 2008).

1.4. Aplicações biotecnológicas de peptidases

As aplicações das peptidases no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia, um conjunto de áreas ligadas à ciência e tecnologia que envolve Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharia Química. Essas aplicações visam o uso de novas matérias-primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas de matérias-primas e produtos. Portanto, do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente utilizável é aquela que garante a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais (ABRAHÃO NETO, 2001).

No segmento têxtil, as peptidases são utilizadas durante o processamento de couros. São aplicadas na fase inicial de limpeza e remoção dos pêlos; já nas fases finais, elas degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes no couro (ABRAHÃO NETO, 2001; WISEMAN, 1985).

Peptidases são utilizadas em todos os tipos de detergentes, sejam eles líquidos ou sabões em pó utilizados em máquinas automáticas de lavagem, e sua função é a degradação de compostos, como sangue, manchas de ovos, leite e etc. (MAURER, 2004).

Já na indústria farmacêutica, as peptidases são utilizadas com o objetivo de facilitar/difícultar as reações bioquímicas da pele, proteger/reparar a pele, destruir/remover parcial ou totalmente algumas estruturas da pele. Na enzimocosmética direta, as enzimas são responsáveis pela proteção da pele contra agentes externos, promoção de *peeling* biológico, limpeza profunda e facilitação da penetração de substâncias ativas (SIM et al., 2003).

Na indústria de alimentos, por exemplo, na produção de laticínios, peptidases têm sido empregadas para reduzir o tempo global da cura do queijo, já que este tempo representa um alto percentual dos custos de produção (VITOLLO, 2001).

A tabela 1 exemplifica algumas fontes de peptidases e suas possíveis aplicações industriais.

Tabela 1: Fontes de obtenção de peptidases e aplicações industriais

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação Industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos.
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelina	Produção de extratos de leveduras, cerveja, panificação, fármacos, amaciamento de carne.
<i>Aspergillus niger</i>	Peptidases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais e bebidas.
<i>Aspergillus oryzae</i>	Peptidases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e panificação.
<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasítica</i> , <i>Mucor miehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>	Peptidases alcalinas	Manufatura de queijo (coagulação de leite).
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Peptidases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria do couro, processamento de carnes, pescados e produtos lácteos.
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Peptidase neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: extraído e modificado de Wiseman, 1991.

1.5. Bioprocesso submerso

A fermentação submersa é definida como um processo fermentativo com excesso de água, sendo o sistema mais empregado industrialmente para a obtenção de uma variedade de importantes metabólitos produzidos por fungos filamentosos (GIBBS et al., 2000). São normalmente utilizados em escala laboratorial devido a sua facilidade de manuseio e controle de parâmetros de bioprocessos (NIGAM, 2009), além de fácil recuperação do micélio, dos esporos extracelulares e das enzimas produzidas. Entretanto, uma vez diluídos, produtos e extratos enzimáticos podem tornar-se menos estáveis que aqueles utilizados na fermentação sólida. O bioprocesso submerso e em estado sólido tem sido amplamente utilizado como meios de obtenção de peptidases. (GIONGO, 2006).

A produção de enzimas em escala industrial é realizada por processo fermentativo submerso devido a este possuir relativa facilidade de cultivo, garantir homogeneidade do meio e facilidade de parâmetros de controle de processo, entretanto possui a desvantagem de maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e consequente possibilidade de desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (LIMA et al., 2001).

1.6. *Scopulariopsis koningii* (Oudem.) Vuill. 1911

Figura 1. *Scopulariopsis* sp. Extraído de Atlas Micologia, data de acesso dez. 2013.

Scopulariopsis spp. é um fungo filamentoso que habita solo, material vegetal, penas, e insetos. É distribuído em todo o mundo. Várias espécies do gênero *Scopulariopsis* têm pleomorfismo e estão também classificados no gênero *Microascus* (MARCHISIO, 2000).

O gênero *Scopulariopsis* é normalmente considerado patogênico, que pode provocar infecções em seres humanos, especialmente em pacientes imunossuprimidos (BALLESTÉ et al. 2003).

O gênero *Scopulariopsis* é único que contém ambos moniliaceous (hialina) e dematiaceous espécies, com várias existências clinicamente significativas. A espécie mais comum é *S. brevicaulis*, um molde hialino. Outras espécies não pigmentadas incluem *S. cândida*, *S. koningii*, *S. Acremonium*, e *S. Flava* que se mantém as colônias brancas na maturidade (ARAÚJO et al. 2003).

Macroscopicamente as colônias do gênero *Scopulariopsis* crescem moderadamente rápidas e maduram dentro de cinco dias. A cor é branca e tornam-se inicialmente castanho claro ou amarelo-claro. Algumas espécies podem formar colônias castanhas mais escuras (CAVALLERA e ASBATI 2006).

Microscopicamente, as características são hifas septadas, conidióforos, anelídios, e conídios também podem ser vistos. Clamidosporas ocasionalmente podem estar presentes.

Conidióforos são semelhantes a hifas simples ou ramificados. Conídios são globosos, piriformes, porém, mais comumente aproximada de paredes, espinhosos, truncados e formando cadeias basipetal (CAVALLERA e ASBATI 2006).

1.7. Liofilização

A estabilização de estruturas proteicas é sempre uma questão importante a ser levantada, independente do âmbito em que o assunto é envolvido. Isso se deve ao fato de estruturas proteicas estarem susceptíveis a diversos tipos de alterações químicas e físicas, tais como deaminações, proteólise, oxidação, agregação, mudanças conformacionais irreversíveis, inibição química por ligantes, etc (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais, teoricamente, devem apresentar uma estabilidade adequada por um longo período de armazenagem em temperatura ambiente. A liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A liofilização é o método de primeira escolha para produtos termolábeis. Entretanto, estudos recentes com espectroscopia por infravermelho têm documentado que os problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar ao desdobramento molecular da proteína. O desdobramento não somente pode levar à desnaturação irreversível da proteína, mesmo se a amostra é reidratada imediatamente, mas também pode reduzir a estabilidade durante o armazenamento da proteína liofilizada (CARPENTER et. al., 1999).

Além do mais, a simples obtenção de uma proteína com conformação estrutural nativa em amostras reidratadas imediatamente após a liofilização não é necessariamente indicativo de estabilização adequada durante a liofilização ou armazenamento. Muitas proteínas apresentam desdobramento estrutural durante a liofilização, mas logo são restauradas se hidratadas imediatamente (CARPENTER et. al., 1999).

As proteínas raramente podem ser liofilizadas sem perda da atividade, geralmente associadas às alterações em sua conformação. Portanto, um agente estabilizante, por exemplo, um açúcar ou um poli-álcool, normalmente é exigido. A adição de um estabilizador, normalmente em uma concentração muito mais alta que a da própria proteína, resulta em uma transição vítrea predominantemente observada durante o resfriamento ou desidratação (WANG, 2000).

O processo de liofilização remove a água de um sistema, baseado no princípio da sublimação do gelo em pressões reduzidas. Quando uma solução proteica é liofilizada, o volume de água que reside nas matrizes de gelo da solução congelada sublima primeiro. As multicamadas da água que envolve a molécula de proteína são removidas, deixando uma monocamada residual de água na superfície da proteína. Esta operação permite a secagem dos materiais termolábeis para diminuir o conteúdo de umidade residual sob moderadas condições de temperatura. O conteúdo de água do material liofilizado no recipiente final pode variar dependendo dos parâmetros da liofilização e pode aumentar durante o armazenamento (TOWNS, 1995).

A quantidade de água presente na proteína tem um significativo impacto na estabilidade e é uma preocupação tanto para o volume do sólido como para as formulações liofilizadas. A umidade residual refere-se ao baixo nível da água da superfície, variando desde menos de 1% até 5%, permanecendo em um produto biológico liofilizado após a remoção do volume do solvente. A umidade residual não deve comprometer a potência e integridade do produto. O nível apropriado de umidade residual para otimizar a estabilidade de uma proteína liofilizada é muito dependente dos caminhos específicos para a decomposição da mesma. Porém, os níveis de umidade residual de certos produtos não deveriam ser tão baixos a ponto do excesso de secagem afetar adversamente a estabilidade do produto. A retenção de água varia de acordo com tipo de ligação, superfície e/ou água retida, e é diferente para cada produto. (TOWNS, 1995).

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi investigar os parâmetros do bioprocesso submerso para a produção de peptidases pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, purificar a peptidase, caracteriza-la bioquimicamente e liofilizar o extrato bruto obtido pelo bioprocesso submerso, para estudos de estabilidade.

Os objetivos específicos deste projeto foram:

- Realizar estudos do bioprocesso submerso do fungo *Scopulariopsis koningii* variando o meio de cultivo em tempo de fermentação, concentração de esporos, efeito da temperatura e pH do meio, determinando quais são os melhores parâmetros do bioprocesso para produção de peptidase visando uma maior produção, menor custo e tempo de produção;
- Realizar a purificação da peptidase obtida do bioprocesso submerso;
- Realizar a caracterização bioquímica da peptidase purificada, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência.
- Determinação dos parâmetros cinéticos e dos subsítios da peptidase purificada, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência.
- Realização do processo de secagem do extrato bruto concentrado obtido do bioprocesso submerso pela técnica de liofilização, e avaliando rendimento do processo e estabilidade do extrato em pó obtido e a influência dos adjuvantes utilizados na estabilidade e atividade da enzima.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A figura 2 mostra o panorama geral das etapas realizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 2. Panorama geral das etapas realizadas neste estudo.

3.1. Identificação e manutenção do micro-organismo

O fungo *Scopulariopsis koningii*, foi identificado pela Prof^a Dr^a Cristina Maria de Souza Motta, responsável pela micoteca da UFPE. Este fungo pertence à coleção de micro-organismos do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Hamilton Cabral. O fungo é mantido em tubo de ensaio e frascos do tipo erlenmeyer, contendo o meio de cultura *Potato Dextrose Agar* (PDA), armazenado a 4°C.

3.2. Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo, foram utilizados vários frascos do tipo erlenmeyer, contendo meio PDA, nos quais o fungo foi mantido a 30°C por sete dias para o crescimento. A superfície do meio no qual o fungo cresceu foi raspado com auxílio de uma espátula esterilizada na presença de água deionizada estéril. O material suspenso foi filtrado em gaze e reunido em um frasco. A concentração de esporo foi determinada em Câmara de Neubauer.

3.3. Bioprocesso em meio submerso

Em erlenmeyer de 250mL foram adicionados 50mL de meio líquido contendo KH_2PO_4 , 0,7% (m/v); K_2HPO_4 , 0,2% (m/v); $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01% (m/v); extrato de levedura, 0,1% (m/v); citrato de sódio, 0,05% (m/v); peptona, 0,1% (m/v) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01% (m/v); descrito por Tran e Nagano (2002), com modificações em relação à concentração de citrato de sódio e peptona, que foram de 0,1% e 1%, respectivamente. Após o preparo, o pH do meio foi corrigido com HCl 1 M para 6,0 e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Este meio foi denominado meio líquido padrão.

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

Após cada bioprocesso, procedeu-se a filtração do material em papel de filtro Whatman nº1, previamente pesado e seco a 45°C durante 48 horas. A massa micelial foi determinada após filtração à vácuo do volume total dos erlenmeyers e secagem dos sólidos a 45°C. Foi realizada a pesagem do papel de filtro diariamente até obtenção de massa constante.

O filtrado foi denominado de extrato enzimático bruto (EB) e foram realizados os ensaios enzimáticos de cada estudo dos bioprocessos, os ensaios foram realizados em triplicata.

Foram realizados estudos variando a concentração de farinha de pena no meio e o tipo de fonte de carbono e nitrogênio, como substrato. Foram analisadas o efeito da variação das concentrações de esporos e H^+ (pH) do meio de cultura. Por fim, foi verificada a influência da temperatura de incubação na produção de peptidase.

Para análise do efeito da farinha de pena no bioprocesso do fungo *Scopulariopsis koningii*, frascos do tipo erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio padrão foram suplementados com diferentes porcentagens de farinha de pena, a saber: 0,2%, 0,4% e 0,8%.

Para análise do efeito da fonte de carbono no bioprocesso do fungo *Scopulariopsis koningii*, frascos do tipo erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio padrão foram suplementados com diferentes fontes de carbono (glicose, frutose e sacarose) na porcentagem de 0,1%.

Para análise do efeito da fonte de nitrogênio no bioprocesso do fungo *Scopulariopsis koningii*, frascos do tipo erlenmeyer de 250mL, contendo 50mL de meio padrão foram suplementados com diferentes fontes de nitrogênio (caseína, sulfato de amônio e ureia) na porcentagem de 0,1%.

Para análise do efeito da concentração de esporos no meio, foi preparado o meio líquido padrão com a melhor concentração de farinha de pena (0,4%), condição na qual o fungo *Scopulariopsis koningii* apresentou maior produção de peptidases. As concentrações de esporos utilizadas foram $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 e 1×10^6 .

Para análise do efeito do pH, foi preparado o meio líquido padrão, suplementado com 0,4% de farinha de pena, devido o seu efeito de modulação positiva na produção de peptidases pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, variando o pH para 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0.

Para análise do efeito da temperatura, foi preparado o meio líquido padrão com a melhor concentração de farinha de pena (0,4%) e com o pH 6,0, ou seja, nas condições nas quais o fungo *Scopulariopsis koningii* apresentou maior produção de peptidases. Em seguida esses meios foram incubados nas temperaturas de 30, 35 e 40°C.

3.4. Sistema de ultrafiltração tangencial

O extrato bruto obtido no bioprocesso submerso, foi concentrado pelo sistema de ultrafiltração tangencial em membranas de 10 kDa, utilizando o sistema *FlexStand GE Healthcare*. A fração que passou pela membrana foi descartada por não apresentar atividade proteolítica. Dessa maneira, a fração que não passou pela membrana apresentou-se concentrada, obtendo o extrato produto da ultrafiltração.

3.5. Purificação

3.5.1. Diálise / Cromatografia

A primeira etapa da purificação da peptidase extracelular consistiu na desalinização do extrato bruto concentrado por diálise, durante 12 horas em tampão acetato 50 mM pH 5. Utilizou-se uma membrana de celulose natural, de diâmetro aproximado 15 mm e poros de 12.000 a 14.000 Daltons.

A amostra resultante da diálise foi aplicada em cromatografia líquida de troca-iônica, utilizando a resina Source Q empacotada em a coluna Tricorn acoplada no sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE). Inicialmente, a resina foi equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5. Para a eluição do material foi realizado um gradiente linear de NaCl 0-1 M com o mesmo tampão. Foram coletados 30 tubos de ensaio contendo 5 mL do eluído cada tubo, sendo o volume de eluição total de 150 mL. Os tubos que apresentaram absorbância em 280 nm foram submetidos à análise da atividade enzimática.

Em seguida, as amostras coletadas com atividade enzimática foram reunidas e aplicadas em coluna cromatográfica contendo a resina de troca iônica Source S. A coluna

também estava acoplada no sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE). A coluna foi equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5. A eluição das amostras foi realizada com um gradiente linear de NaCl 0-200 mM com o mesmo tampão. Foram coletados quatro tubos de ensaio antes do início do gradiente salino contendo 5 mL do eluído cada tubo e 45 tubos de ensaio após o início do gradiente salino contendo 1 mL do eluído cada tubo, totalizando 65 mL do volume de eluição. As amostras que apresentaram absorbância em 280 nm foram submetidas a análise da atividade enzimática.

As frações referentes aos picos com atividade foram submetidas à eletroforese desnaturante SDS-PAGE a 12% para acompanhamento do processo de purificação.

As frações com atividade enzimática foram reunidas e submetidas à cromatografia líquida de gel-filtração, utilizando a resina Superdex-75, equilibrada com tampão acetato 50 mM com 150 mM de NaCl, pH 5 a eluição das proteínas ocorreu no mesmo tampão. O eluído foi coletado em tubo de ensaio, com auxílio de coletor de frações (GE), sendo o volume de eluição de 500 mL. Em seguida foi realizado o ensaio de atividade proteolítica e leituras em 280nm para determinação do perfil de eluição da peptidase.

3.5.2. Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA para confecção da curva padrão.

3.5.3. Avaliação do grau de pureza, tamanho da peptidase e Zimograma

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

A determinação de quantidade de peptidase no extrato bruto foi realizado por zimograma, contendo 3mg/ml de gelatina adicionada ao gel de eletroforese SDS-PAGE 12%, segundo Feitosa et al. (1998) com algumas modificações. A corrida foi realizada a 4°C. Após a corrida o gel foi incubado por 30 minutos em solução de Triton X-100 2,5% para remoção do SDS. Em seguida, este gel foi incubado por 30 minutos em solução tampão contendo Tris-HCl 50 mM, NaCl 200 mM e CaCl₂ 5 mM, pH 7,4, em estufa a 30°C. Após isso, o gel foi corado com *coomassie brilliant blue* “overnight”, e descorado em solução de metanol, ácido acético glacial e água ultra pura.

3.6. Avaliação da atividade proteolítica com substrato caseína

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

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

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

3.7. Avaliação da atividade proteolítica com substrato azocaseína

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

Foi utilizado 100 µL de extrato bruto concentrado diluído em tampão MES pH 5,5 50 mM, na proporção 1:5 + 100 µL de tampão MES pH 5,5 50mM + 200 µL de azocaseína a 1%, preparada no mesmo tampão. A mistura reacional foi incubada por 10 minutos para o BSM na temperatura de 40°C, a mesma foi interrompida com 800 µL de TCA 10%. Para o branco, foi utilizado 200 µL de caseína a 1% (m/v), preparada em tampão MES 50 mM pH 5,5, + 100 µL de tampão MES 50 mM pH 6,5 + 800 µL de TCA e, por ultimo, 100 µL de extrato bruto concentrado diluído em tampão MÊS pH 5,5 50 mM, na proporção 1:5. Os tubos testes e brancos foram centrifugados por 15 minutos a 10000g a 30°C. O volume de 933 µL dos sobrenadantes foram separados e a estes foi adicionado 800 µL de NaOH 1 M, em seguida foram lidos usando cubeta de quartzo contra seus respectivos brancos, nos quais

também foram adicionados 800 μ L de NaOH 1M, a leitura foi feita em 440nm, em espectrofotômetro, Genesys 10S (Thermo) (DUCROS et al., 2009).

3.8. Caracterização bioquímica parcial do extrato do bioprocesso submerso

3.8.1. Efeito de pH e Temperatura

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

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada de 25 a 80°C, com incrementos de 5°C. A reação enzimática foi realizada, como descrito no item 3.7, utilizando tampão no pH ótimo.

3.8.2. Efeito de Íons e Inibidores

Para determinar o efeito de íons sobre a atividade enzimática do extrato bruto concentrado foram preparadas soluções de: NaCl, ZnSO₄, MnSO₄, CoCl₂, CuCl₂, NiSO₄, CaCl₂, KCl, MgCl₂, LiCl, BaCl₂ e AlCl₃ a 100 mM (estoque).

Os inibidores testados foram PMSF, EDTA e ácido Iodoacético (AIA) a 100 mM (estoque) e E-64, fosforamidon e quimostatina a 100 μ M (estoque) segundo protocolo descrito por Dunn (1989).

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

3.9. Ensaios de caracterização bioquímica funcional

3.9.1. Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência

A caracterização bioquímica funcional da peptidase pura, produzida pelo fungo *Scopulariopsis koningii* pelo bioprocesso submerso, foi conduzida utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência. Esse substrato possui em cada extremidade um grupo molecular, onde na região amino-terminal está presente o ácido orto-aminobenzóico (Abz), responsável pela emissão da fluorescência da molécula, e na região

carboxi-terminal, encontra-se o grupo etilenodiamio-dinitro-fenil (EDDnp), grupo responsável pela supressão da fluorescência (CHAGAS et al., 1991).

O substrato funciona da seguinte maneira, enquanto intacto, ou seja, com as extremidades Abz e EDDnp próximas, o grupo EDDnp promove a supressão da fluorescência emitida pelo grupo Abz. Após a ação da peptidase, a qual promove a hidrólise do substrato, ocorre o distanciamento entre os grupos Abz e EDDnp, consequentemente aumento da fluorescência (SANTOS, 2009), figura 3.

Figura 3. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (intacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).

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

A reação enzimática foi realizada em espectrofluorímetro modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific) acoplado com sistema Peltier *4-Position Fluorescence Cell Holder* que controla a agitação e temperatura. As reações ocorreram no interior de cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Os comprimentos de ondas foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm. O *software* utilizado foi o *Luminous Software* version 3.0.

3.9.3. Efeito de pH e Temperatura

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

Foi utilizado o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, na concentração final de $1,2 \times 10^{-3}$ mM. A concentração final da enzima foi de 0,22 mM e a temperatura da reação foi de 40°C.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pela incubação da enzima pura durante 60 minutos a 25°C nas faixas de pH (5,5-9,5) variando o pH com incrementos de 0,5 unidade. Em seguida quantificou-se a fluorescência emitida pelo substrato peptídico de supressão intramolecular, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, quando incubado com a enzima previamente exposta aos diferentes valores de pH. A concentração final de substrato foi de $1,2 \times 10^{-3}$ mM. A concentração final da enzima foi de 0,22 mM, o tampão utilizado foi o MES 100mM pH 6,0, pH ótimo obtido no ensaio anterior, em temperatura de 40°C.

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada de 20 a 65°C, com incrementos de 5°C, quantificando a fluorescência obtida após a reação da enzima pura com o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, sendo que a concentração final de substrato foi de $1,2 \times 10^{-3}$ mM e a de enzima foi de 0,22 mM.

A estabilidade em diferentes temperaturas foi avaliada pela incubação da enzima pura durante 60 minutos na faixa de temperatura (25°C – 55°C) variando a temperatura com incrementos de 5°C. Em seguida quantificou-se a fluorescência emitida pelo substrato peptídico de supressão intramolecular, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, quando incubado com a enzima previamente exposta nas diferentes temperaturas. A concentração final de substrato foi de $1,2 \times 10^{-3}$ mM. A concentração final da enzima foi de 0,22 mM, o tampão utilizado foi o MES 100mM pH 6,0, pH ótimo obtido no ensaio anterior, em temperatura de 40°C.

3.9.4. Efeito de Íons, Inibidores e Sufactantes

Para determinar o efeito de íons sobre a atividade proteolítica da enzima pura, foram preparadas soluções de: NaCl, KCl, LiCl, MnSO₄, ZnSO₄, CoCl₂, CuCl₂, NiCl₂, CaCl₂, MgCl₂, BaCl₂ e AlCl₃ a 100 mM (estoque).

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

Os surfactantes testados foram CTAB, SDS, tween e triton na concentração de 10% (m/v) em água deionizada.

Em cada tubo de reação foi adicionado enzima pura e solução de cada íon ou inibidor, obtendo concentração final de 10 mM dos íons e inibidores, 10 µM para fosforamidon e concentrações de 0,1, 0,2, 0,5 e 1% (m/v) para CTAB, Tween e Triton e concentrações de

0,005, 0,01, 0,05 e 0,1% (m/v) para SDS. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 40 °C. Em seguida, foi realizada a avaliação da atividade proteolítica com o substrato de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, na concentração final de $1,2 \times 10^{-3}$ mM. A concentração final da enzima foi de 0,22 mM, o tampão utilizado foi o MES 100 mM no pH ótimo, em temperatura de 40°C. As reações, as quais foram previamente incubadas com inibidores, íons e surfactantes, foram comparadas com controle, no qual nada foi adicionado.

3.10. Estudos de cinética enzimática

3.10.1. Determinação da concentração molar da enzima purificada

A concentração molar da enzima foi determinada por titulação do sítio ativo com o inibidor EDTA, conforme descrito por Klemencic et al. (2000) com modificações, sendo estimada em 400 nM, em espectrofluorímetro modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific) utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em tampão MES 100 mM, pH 6,0 a 40°C. Os comprimentos de onda de fluorescência foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

3.10.2. Ensaios cinéticos com substrato sintético

A figura 4 mostra o modelo de Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da enzima é dividido em subsítios denominados S_3 , S_2 , S_1 , S'_1 , S'_2 e S'_3 , sendo que, cada subsítio possui um resíduo de aminoácido correspondente no substrato. Modificações em uma determinada posição no substrato, fixando as outras, nos permite avaliar qual aminoácido interage melhor com cada subsítio, desta forma propiciando uma melhor eficiência catalítica da enzima.

Figura 4. Esquema proposto por Schechter e Berger (1967) no qual o sítio catalítico da peptidase é dividido em subsítios, e cada subsítio possui um aminoácido correspondente no substrato, modificado de (GRAHN et al., 1999).

Nos ensaios cinéticos foram estudados variações de posicionamento dos aminoácidos que compõem o substrato, determinando a preferência de ancoragem da enzima conforme a distribuição dos aminoácidos no substrato peptídico. Essas variações de aminoácidos ocorreram em posições definidas como P₃, P₂, P₁, P₁', P₂' e P₃' sendo representada no substrato da seguinte forma Abz-P₃-P₂-P₁-P₁'-P₂'-P₃'-EDDnp. Os parâmetros cinéticos de hidrólise do substrato Abz-KLXSSKQ-EDDnp foram avaliados com variações em **X** nas posições mencionadas (P₁, P₂, P₃, P₁', P₂' e P₃').

As cinéticas enzimáticas foram obtidas pela adição crescente de substrato na cubeta de reação. Os experimentos foram realizados em tampão MES 100mM pH 6,0 a 40°C e espectrofluorímetro, modelo Lumina fluorescence spectrometer (Thermo scientific), com controle de agitação e temperatura de reação utilizando o acessório Peltier 4-Position Fluorescence Cell Holder. Os comprimentos de onda foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

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

3.11. Liofilização

Para realizar o processo de liofilização do extrato, este foi concentrado pelo sistema de ultrafiltração tangencial e submetido à técnica de liofilização juntamente com adjuvante para a produção do extrato bruto seco.

Em béqueres de 10 mL foi adicionado 10 mL de extrato bruto com adição de manitol, glicina ou maltodextrina nas concentrações de 0,5%, 2,5% e 4,5%. O controle utilizado foi o extrato bruto sem adição de adjuvante. Todas as amostras foram congeladas a -25°C antes de serem submetidas ao processo de liofilização.

A secagem foi realizada em um liofilizador (Martin Christin GmbH, modelo Alpha 2-4 SC, Osterode, Alemanha) da seguinte maneira: (1) congelamento a -20°C por 16 h; (2) secagem primária com 1,0 mbar de vácuo a -20°C por 57 h e (3) secagem secundária com 0,1 mbar de vácuo a 20°C por 2 h. Após isso, foi realizado a análise do rendimento de todo o processo.

3.11.1. Estabilidade das micropartículas

A avaliação das micropartículas obtidas pela liofilização foi realizada com a exposição às temperaturas de 4°C, 25°C e 60°C durante os seguintes períodos de dias 0, 07, 18 e 32. Os

pós foram alíquotados de forma ideal para cada ensaio, armazenados em tubos de polipropileno de 2mL, devidamente lacrado. Passado os dias que haviam sido determinados para a avaliação, as micropartículas foram ressuspensas e foram submetidas ao ensaio de avaliação de atividade proteolítica conforme o item 3.6 e quantificação das proteínas totais conforme descrito por Bradford (1976)

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Bioprocesso submerso

Segundo CRUEGER e CRUEGER, (1993), o meio de cultura utilizado para a produção de peptidase deve conter uma fonte de carbono, uma fonte de nitrogênio e alguns fatores necessários para o melhor desenvolvimento da linhagem. É importante também considerar a necessidade de um indutor ou as possíveis repressões devido a presença de algum composto presente no meio de fermentação, como por exemplo, a repressão catabólica promovida pela glicose, para algumas linhagens.

No processo de tentar otimizar a produção peptidase pelo fungo *S.koningii*, na fermentação ou bioprocesso submerso, foram avaliados três fontes de carbono - glicose, frutose e sacarose (0,1%) – na produção e secreção de peptidase. De acordo com os resultados obtidos (figura 5) pode-se sugerir que não há necessidade de suplementação com fontes de carbono, uma vez que a produção de peptidase pelo fungo *Scopulariopsis koningii* foi inferior quando comparada com o controle (meio padrão) que não contem fonte de carbono suplementar. Conforme podemos observar, a adição de fonte de carbono promoveu uma repressão na produção e secreção de peptidases. Dentre as fontes de carbono que foram adicionadas, a glicose promoveu a maior produção com 50 U/mL em 72 horas de fermentação. A produção de peptidase utilizando o meio controle foi de 400 U/mL com 48 a 72 horas de fermentação.

Figura 5: Influência de fontes de carbono suplementar na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo *S.koningii* para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm e concentração de 5×10^5 esporos/mL do meio.

Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Singh (1998) com *Malbranchea gypsea*, Ramnani e Grupta (2004) com *Bacillus licheniformis* e Anbu e colaboradores (2007) com *Scopulariopsis brevicaulis*. Estes estudos relataram que uma variedade de açúcares (xilose, lactose, maltose, sacarose e manitol) suprimiu a produção de peptidase quando adicionados ao meio de cultura. Relatos de supressão de produção enzimática por açúcares são comuns em fungos e outros micro-organismos. Por exemplo, a repressão catabólica de peptidase por sacarose em *Neurospora crassa* (DRUCKER, 1975), por frutose em *Trichophyton rubrum* (MEEVOOTISOM e NIEDERPRUEM, 1979) e por maltose em *B. licheniformis* (SEN e SATYANARAYANA, 1993).

Para analisar a influência de fonte de nitrogênio na produção e secreção de peptidase foi utilizado sulfato de amônia e ureia como fonte inorgânica e caseína como fonte orgânica todas na porcentagem de 0,1%. A figura 6 apresenta o resultado obtido e sugere que não é necessária a suplementação do meio com fonte de nitrogênio, pois todas as fontes utilizadas não promoveram um aumento na produção de peptidase, sendo inferior ao controle, e também sugere que o fungo *Scopulariopsis koningii* tem preferência por fontes orgânicas de nitrogênio em relação às inorgânicas, pois com 0,1% de caseína observamos a produção de aproximadamente 250 U/mL em 72 horas de fermentação, e na presença de ureia e sulfato de amônio, a produção foi praticamente nenhuma. Quanto a produção utilizando o meio controle, a produção foi de 400 U/mL durante 48 a 72 horas de fermentação.

Figura 6: Influência de fontes de nitrogênio na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo *S.koningii* para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm e concentração de 5×10^5 esporos/mL do meio.

O fungo *Scopulariopsis koningii* apresentou produção de peptidases quando cultivado em meio de cultura suplementado farinha de pena. A atividade máxima obtida foi 1.427 U/mL em 48 horas de fermentação utilizando 0,8% do substrato farinha de pena (figura 7).

Figura 7: Influência de farinha de pena como substrato na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo *S.koningii* para a produção de peptidase em pH 6,0 incubado a 30°C e 120 rpm e concentração de 5×10^5 esporos/mL do meio.

Após as 48 horas, ocorreu uma queda na secreção da peptidase, observado pela queda de atividade. A concentração de 0,4% de farinha de pena também promoveu um efeito indutor

na secreção de peptidase, em comparação com o meio controle, sendo a produção muito próxima à concentração de 0,8% de FP, e a secreção da peptidase permaneceu superior por até 168 horas de fermentação quando comparado com a concentração de 0,8% de FP (figura 7). Dessa forma, a concentração escolhida para dar seguimento às análises foi a de 0,4%.

Desta forma, ao analisarmos os resultados obtidos na suplementação com fontes de carbono e nitrogênio no meio de fermentação (figuras 5 e 6), foi possível sugerir que não é necessária a suplementação com tais fontes, uma vez que o meio com adição de farinha de pena é suficiente para a produção de peptidase devido à alta concentração de proteínas (N_2 orgânico) presente no meio (cerca de 83%), de acordo com laudo analítico realizado pela empresa HIPALA – Hidrogenação e Ingredientes Ltda na cidade de Guarulhos-SP. Resultado muito semelhante foi observado por Moreira e colaboradores (2006) com *Myrothecium verrucaria* e Muhsin e Hadi (2002) com *Aspergillus flavus* utilizando meio com farinha de pena.

Todas as análises posteriores foram realizadas com suplementação do meio com farinha de pena.

Em seguida, foi realizada a análise da influência da concentração de esporos no meio. Foram analisadas as concentrações de $2,5 \times 10^5$, 5×10^5 e 10×10^5 esporos/mL do meio. O resultado obtido pode ser observado na figura 8, sendo 5×10^5 a melhor concentração de esporos utilizando farinha de pena como substrato.

Figura 8: Influência da concentração de esporos na determinação das melhores condições de meio para bioprocessamento submerso do fungo *S.koningii* para a produção de peptidase em pH 6,0 e meio suplementado com 0,4% de farinha de pena, incubado a 30°C e 120 rpm.

O efeito do pH sobre a produção e secreção da peptidase está relacionada com a quantidade de prótons disponíveis no meio, que influencia no transporte de nutrientes e das reações enzimáticas no bioprocesso. Na avaliação do efeito do pH sobre a síntese e secreção de peptidase pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, pode-se observar que a máxima produção foi observada no pH 6,0 conforme mostrado na figura 9A. Com o aumento do pH houve a diminuição na síntese e secreção de peptidase.

A temperatura também influencia no resultado de síntese e secreção de peptidase. A análise do efeito da temperatura na produção de peptidase pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, revelou que a temperatura mais adequada para o bioprocesso é de 30 °C, uma vez que no bioprocesso a 40°C não foi detectada atividade enzimática (figura 9B). A avaliação de temperatura revelou que um aumento na temperatura do bioprocesso acarreta na diminuição da produção secreção de peptidase produzida pelo fungo *Scopulariopsis koningii*.

Figura 9: Determinação das melhores condições de meio para fermentação submersa do fungo *S. koningii* para produção de peptidase suplementado com 0,4% de farinha de pena e 120 rpm. (A) Influência de pH incubado a 30°C; (B) Influência Temperatura em pH 6,0.

4.2. Caracterização bioquímica parcial do extrato do bioprocesso submerso

Os experimentos de caracterização da atividade proteolítica do extrato enzimático bruto concentrado da fermentação submersa foram realizados, a fim de avaliar as características bioquímicas da peptidase e seu potencial de hidrólise enzimática.

4.2.1. Efeito do pH sobre a atividade enzimática

As enzimas possuem grupos ionizáveis, pertencentes aos resíduos de aminoácidos da molécula sendo sensíveis à concentração hidrogênionica do meio, de forma que as alternâncias de pH podem mudar sua conformação, sua capacidade de ligação com o substrato e a atividade catalítica dos grupos que formam o sítio ativo (WISEMAN, 1991).

Neste estudo foi utilizado azo-caseína como substrato entre o intervalo de pH de 4,5 a 10,5. O pico máximo de atividade foi no pH 6,5 (figura 10). A peptidase produzida a partir do meio de cultura contendo farinha de pena apresenta ampla faixa de atividade em função da variação do pH sendo que no pH 10,5 a enzima mantém 66% de atividade proteolítica. Este resultado está em concordância com serino peptidase obtida a partir de outra fonte fúngica, tal como *Aspergillus parasiticus* (ANITHA e PALANIVELU, 2012).

Figura 10: Determinação do pH ótimo do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo *S. koningii*. Atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína a 40°C.

4.2.2. Efeito da temperatura sobre a atividade enzimática

A temperatura é uma variável crítica em alguns processos enzimáticos, produzindo simultaneamente efeitos opostos de aumento de atividade enzimática e sua inativação (ILLANES et al., 2000). A variação da atividade enzimática em função da temperatura é resultado do aumento da agitação das moléculas, que aumenta a frequência das colisões entre o substrato e a enzima, aumentando a atividade. Acima da temperatura ótima, o aumento da temperatura promove a desnaturação da enzima (TREVAN et al., 1990; SCRIBAN, 1985). Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da enzima realizou-se a hidrólise da azo-caseína incubada em diferentes temperaturas, já no pH ótimo. A temperatura ótima foi estimada em 55 ° C para a enzima produzida pelo meio de cultura contendo farinha de pena (figura 11). Peptidases de outros fungos como *Trichoderma atroviridae*, *Doratomyces microsporus* e *Aspergillus oryzae* também apresentaram temperaturas ótimas entre 50 e 55°C. Em geral, a maioria das peptidases apresenta temperatura ótima entre 50 ° C e 55° C (ANITHA e PALANIVELU, 2012).

Figura 11: Determinação da temperatura ótima do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo *S. koningii* com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES 50 mM pH 6,5

4.2.3. Classificação das peptidases

A atividade proteolítica do extrato bruto foi fortemente inibida por PMSF, cerca de 80%, e apresentou fraca inibição por EDTA, sugerindo a presença de uma serino peptidase dependente de íons, ou duas ou mais peptidases (figura 12A).

Figura 12: (A) Influência de inibidores na atividade enzimática do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo *S. koningii* com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 6,5 incubado a 55°C. (B) Zimograma em gel SDS-PAGE 12% com adição de gelatina (3mg/mL) para verificação de atividade proteolítica *in situ*.

Para verificar a presença de mais de uma peptidase, foi realizado o zimograma em gel SDS-PAGE 12% contendo gelatina (3mg/mL). O resultado revelou duas bandas com

atividade proteolítica sobre gelatina (figura 12B), confirmando a hipótese da existência de duas peptidases no extrato bruto obtido no bioprocesso submerso e sugere a provável complementariedade entre elas, devido ao fato das porcentagens de inibição da atividade por PMSF (80%) e EDTA (20%), indicando que as concentrações das peptidases no extrato bruto são proporcionais.

4.2.4. Efeito de íons sobre a atividade enzimática

O efeito de íons sobre a atividade catalítica em peptidases muitas vezes variável pode promover um efeito positivo (ativação) ou negativo (inibição). Os íons Ca^{2+} , Mg^{2+} e Ba^{2+} promovem um efeito positivo sobre a atividade peptídica contida no extrato enzimático. Na presença de Ca^{2+} foi observado um aumento de 40%. Já na presença de Ba^{2+} e Mg^{2+} o aumento foi de 30% e 20%, respectivamente (figura 13). Algumas peptidases requerem íons metálicos divalentes como o Ca^{2+} , Mg^{2+} ou a combinação desses íons para a obtenção de uma maior atividade (KUMAR e TAKAGI, 1999).

Figura 13: Influência de íons sobre atividade enzimática do extrato enzimático bruto concentrado, proveniente da fermentação submersa do fungo *S. koningii* com atividade proteolítica determinada com substrato azocaseína em tampão MES pH 6,5 incubado a 55°C.

Acredita-se que esses íons protegem a enzima contra a desnaturação em função da temperatura, mantendo a atividade em altas temperaturas (SATOSHI e NORIAKI, 2004) e podem estimular a atividade da enzima atuando como sal ou pontes de íon que estabilizam a enzima na sua conformação ativa (BALAJI et al., 2008; SAREEN e MISHRA, 2008).

Foi observada a perda de atividade em torno de 25% na presença do íon Zn^{2+} (figura 13). O efeito inibidor desse íon é relatado em algumas metalopeptidases, que resulta de pontes formadas entre o hidróxido de zinco (ZnOH) e íons de zinco catalíticos no sítio ativo

(RIFFEL et al., 2007). Este resultado é semelhante à peptidase obtida pelo *Bacillus*, mas em contraste com as características de uma peptidase produzida pelo fungo de *Scopulariopsis brevicaulis*, que não foi inibida por Zn^{2+} (ANITHA e PALANIVELU, 2012).

4.3. Purificação

Processo de purificação de proteínas não é somente a remoção de impurezas, mas também a concentração da proteína em questão e seu deslocamento para um ambiente onde esta se apresenta estável e adequada para a aplicação pretendida. A homogeneidade de proteínas requerida depende da aplicação final. Alto grau de pureza é necessário para estudos estruturais ou aplicações terapêuticas, e baixo ou moderado grau de pureza para aplicações industriais, como na indústria alimentícia ou na produção de detergentes domésticos (QUEIROZ et al., 2001).

Tabela 2. Etapas de purificação da peptidase, produzida em bioprocesso submerso, pelo fungo *Scopulariopsis koningii*.

Etapas	Atividade Total (U)	Proteína Total (µg)	Atividade Específica U/mg	Recuperação (%)	Purificação (vezes)
Extrato Bruto	1061030,1	2,04954	488389,5	100,0	1,00
Extrato Bruto concentrado	884276,0	11,01951	486341,7	83,3	1,00
Diálise	872089,4	9,89353	534226,7	82,2	1,09
Source Q	883976,7	1,79406	995401,2	83,3	2,04
Source S	221167,3	0,57346	1113042,1	20,8	2,28
Superdex 75	94863,0	0,18552	1721650,0	8,9	3,53
Concentrado	63960,3	0,64916	1658718,3	6,0	3,40

Depois de submetido à ultrafiltração tangencial, o extrato bruto concentrado foi submetido à dessalinização por diálise. As etapas de purificação estão descritas na tabela 2. A purificação da peptidase foi realizada em seis etapas, obtendo rendimento final de 6%, e purificação de 3,4 vezes. O processo de purificação apresentou reprodutibilidade e a peptidase foi obtida na sua forma homogênea.

A amostra resultante da diálise foi aplicada em cromatografia líquida de troca-iônica, utilizando a resina Source Q empacotada em a coluna Tricorn acoplada no sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE). Inicialmente, a resina foi equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5. Para a eluição do material proteico foi realizado um gradiente linear de NaCl 0-1 M. Foram coletados 30 tubos de ensaio contendo 5 mL. Os tubos que apresentaram absorbância em 280 nm foram submetidos à análise da atividade enzimática. As frações que

apresentaram atividade foram eluídas no primeiro segmento do processo cromatográfico, ou seja, antes do início do gradiente salino, desta forma, podemos destacar que não ocorreu a adsorção das moléculas da enzima com a resina de troca aniônica. É importante ressaltar que o cromatograma apresentou picos no segmento após o início do gradiente salino, porém sem atividade enzimática.

Em seguida, as amostras coletadas com atividade enzimática foram reunidas e aplicadas em coluna cromatográfica contendo a resina de troca iônica Source S. A coluna também estava acoplada no sistema de purificação ÄKTA Purifier (GE). A coluna foi equilibrada com tampão acetato 50 mM pH 5. A eluição das amostras foi realizada com um gradiente linear de NaCl 0-200 mM. Foram coletados 45 tubos de ensaio contendo 1 mL, e aquelas que apresentaram absorbância em 280 nm foram submetidas a análise da atividade enzimática.

Ao contrário do resultado obtido com a resina aniônica, as frações que apresentaram atividade foram eluídas no segundo segmento do processo cromatográfico, ou seja, após o início do gradiente salino, o que constata que as moléculas da enzima estão carregadas positivamente, e ocorreu a adsorção com a resina. Ao analisar o cromatograma obtido nessa etapa, constatamos a presença de dois picos que apresentaram atividade enzimática, como é possível observar na figura 14. As frações referentes aos picos com atividade foram submetidas à eletroforese desnaturante SDS-PAGE a 12% para acompanhamento do processo de purificação.

Figura 14: Perfil de eluição das proteínas contidas nas frações da etapa de troca aniônica com a resina Source Q, utilizando a cromatografia de troca catiônica com resina Source S, equilibrada com tampão acetato 50 mM, pH 5. A eluição das amostras foi realizada com um gradiente linear de NaCl 0-200 mM em mesmo tampão. O fluxo foi mantido em 1mL/min, sendo coletadas frações de 1mL.

A peptidase presente nas frações do pico I está em processo de purificação para obtenção de sua forma homogênea. As frações com atividade enzimática do pico II foram reunidas e submetidas à cromatografia líquida de gel-filtração, utilizando a resina Superdex-75, equilibrada com tampão acetato 50 mM com 150 mM de NaCl, pH 5 e eluída com o mesmo tampão. Foram coletados 80 tubos de ensaio com 5 mL cada tubo. Conforme o cromatograma apresentado na figura 16 podemos observar a presença de um pico de atividade enzimática e alguns picos de proteínas totais. A figura 15 apresenta o gel SDS-PAGE a 12% das amostras eluídas da cromatografia de troca-iônica (resina Source S). A banda superior é referente ao pico II e a banda inferior ao pico I da figura 14.

Figura 15: Gel de eletroforese desnaturalante SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata, das frações eluídas da cromatografia de Troca-Iônica (resina Source S).

Figura 16: Perfil de eluição do pool proteico, utilizando a resina Superdex-75 equilibrada com tampão acetato 50 mM com 150 mM de NaCl, pH 5 e eluída com o mesmo tampão. O fluxo foi de 0,62 mL/min, e frações de 5mL.

Figura 17: Gel SDS-PAGE a 12%, corado com nitrato de prata das etapas de produção da peptidase pelo fungo *S. koningii* (a) marcador de baixa massa molecular e (b) peptidase purificada pela cromatografia de exclusão de massa utilizando resina superdex-75.

Analizando a figura 17, podemos observar que a peptidase encontra-se pura, e a determinação da massa molecular foi estimada em 45 kDa, após análise do gel pelo *software* ImageLab comparando com o marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare). Assim podemos concluir que o processo de purificação da peptidase, produzida pelo fungo *Scopulariopsis koningii* no bioprocessamento submerso, é eficiente.

4.4. Ensaios de caracterização bioquímica funcional

Após realizar o processo de purificação, a peptidase selecionada foi submetida a caracterização bioquímica, assim como os parâmetros cinéticos obtidos com diferentes substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência.

A determinação do comportamento da atividade proteolítica em diferentes condições de pH e temperatura são fundamentais para o conhecimento de suas propriedades e determinação de potenciais aplicações de acordo com as condições ótimas para reação, assim como sua estabilidade.

O ensaio de atividade enzimática em diferentes valores de pH mostrou que a maior atividade proteolítica foi obtida em pH 6,0 com perfil decrescente de atividade tanto com o aumento quanto com a diminuição de pH (Figura 18). Apesar do fato de a maioria das metalopeptidases exibirem pH ótimo próximo da neutralidade (SUMANTHA et al, 2005), a peptidase secretada pelo fungo *S.koningii* exibiu um comportamento diferente, mantendo

cerca de 90% da atividade proteolítica no pH 5,5 e 6,5 em relação ao pH 6,0. Resultado semelhante foi relatado por Hatanaka e colaboradores, que estudou uma metalo peptidase, produzido por *Streptomyces septatus*, exibindo um pH ótimo de 6,0.

Figura 18. Efeito do pH sobre a atividade e estabilidade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *S. koningii*. As atividades estão expressas em atividade relativa sendo que o 100% de atividade corresponde ao maior valor de atividade obtido no ensaio em questão. Condições de reação – Efeito de pH (substrato peptídico P₁R a 40°C).

A maior atividade enzimática foi a 40°C, mantendo cerca de 90% da atividade entre 35 – 50°C, quando a enzima foi incubada em diferentes temperaturas. A partir de 55°C, no qual a peptidase possui aproximadamente 80% de atividade proteolítica, pode ser observada uma redução na capacidade de clivagem da enzima (Figura 19). Proteases de origem fúngicas mostraram resultados semelhantes para temperaturas ótimas tais como 45°C para *Colletrichum gloesporiodes* (DUNAEVSKY et al, 2007), 50°C para *Trichoderma reesei* (DIENES et al, 2007) e *Fusarium culmorum* (PEKKARINEN et al, 2002).

A avaliação da estabilidade da enzima a 25°C, após 60 minutos em diferentes valores de pH (5,0-10,0) mostrou que a peptidase foi capaz de manter sua atividade acima de 80% de sua atividade inicial, em todas as faixas de pH (Figura 20).

Figura 19. Efeito da temperatura sobre a atividade e estabilidade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *S. koningii*. Estabilidade de temperatura. As atividades estão expressas em atividade relativa sendo que o 100% de atividade corresponde ao maior valor de atividade obtido no ensaio em questão. Condições de reação – Efeito de temperatura (substrato peptídico P₁R em pH 6,0).

Figura 20. Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Scopulariopsis koningii*, frente à exposição a diferentes valores de pH. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C, pH 6,0.

A avaliação da estabilidade da enzima em diferentes temperaturas e tempos mostrou uma boa capacidade da enzima em manter sua atividade enzimática. Após exposição até 50 °C durante 60 minutos, a enzima conseguiu manter cerca de 80% de sua atividade inicial. Na temperatura de 55 °C até 30 minutos conseguiu manter cerca de 80% de sua atividade e após 60 minutos cerca de 60% de sua atividade proteolítica (Figura 21).

Figura 21. Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Scopulariopsis koningii*, frente à exposição a diferentes valores de temperatura. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C, pH 6,0.

Os íons podem apresentar diferentes comportamentos sobre a atividade da peptidase. A atividade residual foi determinada em comparação com o controle no qual não foi adicionada solução contendo íons. A atividade relativa do controle foi assumida como 100%. Na tabela 3 é possível observar que nas condições de ensaio utilizadas houve modulação positiva expressiva pelos íons monovalentes Li^+ , Na^+ e K^+ na ordem de 10%, 20% e 30%, respectivamente. O íon Cu^{+2} proporcionou a inativação da enzima em um percentual de 87,6%. Ghorbel e colaboradores (2003) estudando o efeito de metais sobre a atividade da protease produzida por *Bacillus cereus* BG1, encontraram uma redução de 28 e 35% na atividade da enzima em presença de Zn^{2+} e Cu^{2+} , respectivamente. Segundo estes autores, esses cátions podem reduzir a estabilidade enzimática por desestabilizar as cargas negativas, resultando em repulsão na molécula de proteína, o que pode acarretar em perda de atividade enzimática. De acordo com o Cu^{2+} provavelmente pode reagir com cisteínas promovendo oxidação e formação de cistina (Cys-Cys) afetando a estrutura da enzima e, consequentemente, o acesso ao sítio ativo.

Tabela 3. Efeito de íons sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *Scopulariopsis koningii*. As atividades estão expressas em atividade residual sendo que o 100% de atividade corresponde ao valor de atividade obtido no ensaio sem adição de íons (Controle), submetidas à reação com substrato peptídico Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C, em pH 6,0.

Íons	Atividade residual (%)
Potássio	142,1±4,1
Sódio	130,7±9,4
Lítio	111,6±7,1
Controle	100,0±13,3
Cálcio	72,9±3,9
Magnésio	71,3±2,5
Manganês	68,1±1,2
Zinco	50,4±4,9
Cobalto	45,3±6,8
Níquel	40,6±2,3
Bário	33,5±2,6
Alumínio	28,1±3,6
Cobre	2,4±0,1

O efeito de inibidores sobre a atividade da peptidase produzida nos permite indicar a possível classe à qual a peptidase pertence. Os inibidores utilizados foram fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), ácido iodoacético (AIA), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e fosforamidon. Na tabela 4 é possível observar que nas condições de ensaio utilizadas houve inibição da atividade proteolítica de 85,3% e 78,9% por fosforamidon e EDTA, respectivamente.

O EDTA é um quelante de cátions divalentes que são fundamentais para a atividade de metalo peptidases e o fosforamidon é um inibidor de metalo peptidases, a inibição por esses dois reagentes indica que a peptidase purificada pertence à classe das metalo peptidases.

Tabela 4. Efeito de inibidores sobre a atividade da peptidase purificada obtida em bioprocesso fermentativo submerso do fungo *S. koningii*. As atividades estão expressas em atividade residual sendo que o 100% de atividade corresponde ao valor de atividade obtido no ensaio sem adição de íons (Controle). Para o ensaio as amostras foram previamente incubadas por 5 minutos com concentração final de inibidores de 5 mM (PMSF, EDTA e AIA) ou 5µM (Fosforamidon) e submetidas a reação com substrato peptídico Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C, em pH 6,0.

Inibidores	Atividade residual (%)
Controle	100,0±1,8
PMSF	94,8±9,9
Fosforamidon	14,7±5,3
EDTA	21,1±1,7
AIA	98,3±0,1

Para avaliar as interações presentes na peptidase estudada foi realizado um estudo com diferentes surfactantes (Figura 22A). Na presença do surfactante CTAB, a enzima apresentou atividades residuais entre 20% e 40%. Os surfactantes Tween e Triton mantiveram a atividade proteolítica acima de 80% em todas as concentrações avaliadas, sendo que na concentração de 0,1% o Triton proporcionou um aumento de 20% na atividade em relação à atividade sem adição de surfactantes.

Figura 22. (A) Influência de diferentes concentrações dos surfactantes CTAB, Tween, Triton e SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *S. koningii* sob bioprocessamento submerso. (B) Influência de diferentes concentrações do surfactante SDS sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada do extrato enzimático produzido pelo fungo *S. koningii* sob bioprocessamento submerso. O ensaio foi determinado na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C, em pH 6,0.

O surfactante SDS proporcionou uma ativação na atividade proteolítica nas menores concentrações (0,005 e 0,01%), sendo que na concentração de 0,005% o aumento foi de aproximadamente 30%. Assim como os resultados obtidos por Zanphorlin e colaboradores (2011), quando a concentração de SDS alcançou o valor de 0,1%, a atividade enzimática foi praticamente nula (figura 22B).

4.5. Estudos de cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos K_m , k_{cat} e k_{cat}/K_m da metalo peptidase purificada do fungo *S. koningii* foram determinados utilizando os substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência. O substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp é considerado o substrato padrão, no qual foram realizadas as substituições dos aminoácidos nas posições P_3 , P_2 , P_1 , P'_1 , P'_2 e P'_3 .

No subsítio S_1 , os melhores substratos continham Phe e Gln na posição P_1 com hidrólises de 29468 e 27296 $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. O substrato contendo Glu nesta

posição foi o que apresentou maior afinidade para o subsítio S₁ da peptidase, mas também apresentou uma das menores eficiências catalíticas para este subsítio, indicando que a interação entre este substrato e o subsítio correspondente é forte, ao ponto que não ocorreu à catálise. Neste subsítio não ocorreu à hidrólise dos substratos contendo Pro na posição P₁ (Tabela 5).

Tabela 5. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S₁, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₁, nas condições de ensaio a 40 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ . μM ⁻¹)
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
*Abz-KLFSSKQ-EDDnp	44,7	0,0015	29468,4
***Abz-KLQSSKQ-EDDnp	26,6	0,0010	27296,1
*Abz-KLVSSKQ-EDDnp	21,5	0,0012	18537,2
*Abz-KLASSKQ-EDDnp	24,7	0,0014	17803,6
****Abz-KLKSSKQ-EDDnp	11,7	0,0007	16426,4
*Abz-KLWSSKQ-EDDnp	16,0	0,0010	16219,0
*Abz-KLMSSKQ-EDDnp	20,2	0,0014	14441,9
***Abz-KLTSSKQ-EDDnp	35,3	0,0030	11874,4
***Abz-KLSSSKQ-EDDnp	17,9	0,0018	10176,5
***Abz-KLYSSKQ-EDDnp	19,8	0,0020	9807,1
**Abz-KLDSSKQ-EDDnp	15,4	0,0024	6497,0
****Abz-KLHSSKQ-EDDnp	14,5	0,0024	6088,5
*Abz-KLISSKQ-EDDnp	4,6	0,0008	5952,5
**Abz-KLESSKQ-EDDnp	2,4	0,0004	5849,0
***Abz-KLNSSKQ-EDDnp	9,8	0,0018	5345,3
*Abz-KLLSSKQ-EDDnp	17,3	0,0033	5290,3
*Abz-KLPSSKQ-EDDnp	Não hidrolisa		

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

Em relação ao subsítio S₂, o substrato contendo Thr em P₂ apresentou a melhor eficiência catalítica de 42311 mM⁻¹s⁻¹ para a série estudada, seguido de Met com 24172 mM⁻¹s⁻¹. As maiores afinidades foram identificadas para os aminoácidos Thr e Ile, ambos com Km de 0,0002 mM. Neste subsítio não ocorreu a hidrólise do substrato contendo Asp na posição P₂ (Tabela 6).

Tabela 6. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S₂, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₂, nas condições de ensaio a 40 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ · μM ⁻¹)
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
***Abz-KTRSSKQ-EDDnp	6,9	0,0002	42311,1
*Abz-KMRSSKQ-EDDnp	8,5	0,0004	24171,8
****Abz-KRRSSKQ-EDDnp	10,5	0,0006	18893,5
*Abz-KIRSSKQ-EDDnp	3,9	0,0002	18219,4
*Abz-KGRSSKQ-EDDnp	13,3	0,0008	15767,6
*Abz-KFRSSKQ-EDDnp	37,6	0,0026	14713,7
*Abz-KVRSSKQ-EDDnp	6,6	0,0006	11506,0
***Abz-KYRSSKQ-EDDnp	18,1	0,0017	10952,8
****Abz-KHRSSKQ-EDDnp	3,0	0,0003	10654,1
***Abz-KQRSSKQ-EDDnp	7,3	0,0007	10608,9
*Abz-KPRSSKQ-EDDnp	17,6	0,0019	9281,8
***Abz-KNRSSKQ-EDDnp	4,4	0,0005	8248,0
***Abz-KERSSKQ-EDDnp	7,1	0,0010	7088,4
***Abz-KSRSSKQ-EDDnp	1,8	0,0003	5091,9
*Abz-KWRSSKQ-EDDnp	2,3	0,0006	3995,3
**Abz-KDRSSKQ-EDDnp	Não hidrolisa		

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

No subsítio S₃, o substrato contendo Val em P₃ apresentou a melhor eficiência catalítica de 31163 mM⁻¹s⁻¹ seguido de Ser com 24601 mM⁻¹s⁻¹. As maiores afinidades foram identificadas para os aminoácidos Val e Trp, ambos com KM de 0,0004 mM. Neste subsítio todos os substratos estudados foram hidrolisados (Tabela 7).

Tabela 7. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S₃, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P₃, nas condições de ensaio a 40 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ · μM ⁻¹)
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
*Abz-VLRSSKQ-EDDnp	11,6	0,0004	31163,1
***Abz-SLRSSKQ-EDDnp	17,9	0,0007	24601,5
***Abz-YLRSSKQ-EDDnp	30,7	0,0019	15783,4
*Abz-MLRSSKQ-EDDnp	9,6	0,0006	15699,9
****Abz-HLRSSKQ-EDDnp	27,2	0,0017	15663,9
*Abz-ALRSSKQ-EDDnp	16,9	0,0011	15299,6
****Abz-RLRSSKQ-EDDnp	22,8	0,0017	13091,6
***Abz-NLRSSKQ-EDDnp	13,8	0,0011	12717,0
*Abz-ILRSSKQ-EDDnp	18,4	0,0015	12590,2
*Abz-FLRSSKQ-EDDnp	11,0	0,0009	11939,1
*Abz-LLRSSKQ-EDDnp	10,0	0,0009	11230,3
**Abz-DLRSSKQ-EDDnp	12,2	0,0017	7351,2
*Abz-WLRSSKQ-EDDnp	2,8	0,0004	7134,2
***Abz-QLRSSKQ-EDDnp	11,2	0,0018	6361,3

**Abz-ELRSSKQ-EDDnp	19,3	0,0034	5656,3
*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico			

Dentre os subsítios não linha, ou seja, S₁, S₂ e S₃, o subsítio que apresentou maiores valores de eficiência catalítica e melhor afinidade foi o subsítio S₂, quando a posição P₂ do substrato era ocupada por um aminoácido de cadeia lateral polar não carregada. Dentre os subsítios testados, houve uma maior afinidade da peptidase quando aminoácidos de cadeias laterais apolares (aromáticos e cadeias alifáticas) e polares neutras ocupavam as posições P₁, P₂ e P₃.

Aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente não foram bem aceitos em qualquer um dos três subsítios, apresentando baixa eficiência catalítica, apesar da alta afinidade apresentada quando glutamato estava na posição P₁. O resultado encontrado é semelhante às análises relatadas para metalo peptidases, na posição P₁, secretadas por *P. aeruginosa* (MAEDA e MORIHARA, 1995), *S. marcescens* (LOUIS et al, 1999) e *Proteus mirabilis* (FERNANDES et al, 2000).

No subsítio S'₁, os melhores substratos continham Val e Ile na posição P'₁ com hidrólises de 36124 e 25726 mM⁻¹s⁻¹. Os substratos contendo Val e Ile nesta posição apresentaram as maiores afinidades para o subsítio e as maiores eficiências catalíticas para este subsítio, de forma que a forte interação entre este substrato e o subsítio facilitou a catálise (Tabela 8).

Tabela 8. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S'₁, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P'₁, nas condições de ensaio a 40 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ . μM ⁻¹)
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
*Abz-KLRVSKQ-EDDnp	9,8	0,0003	36123,6
*Abz-KLRISKQ-EDDnp	12,8	0,0005	25725,8
****Abz-KLRRSKQ-EDDnp	10,6	0,0006	19045,1
*** Abz-KLRQSKQ-EDDnp	16,1	0,0011	15334,4
*Abz-KLRASKQ-EDDnp	18,0	0,0012	14454,3
*Abz-KLRFSKQ-EDDnp	18,1	0,0014	13320,2
* Abz-KLRYSKQ-EDDnp	40,9	0,0033	12422,5
*Abz-KLRWSKQ-EDDnp	13,8	0,0014	9921,8
**Abz-KLRESKQ-EDDnp	36,3	0,0045	8091,2
****Abz-KLRHSKQ-EDDnp	5,2	0,0007	7951,1
*Abz-KLRPSKQ-EDDnp	15,3	0,0022	6935,2
*Abz-KLRMSKQ-EDDnp	17,6	0,0028	6240,8
*Abz-KLRDSKQ-EDDnp	33,5	0,0059	5657,4
*Abz-KLRGSKQ-EDDnp	17,4	0,0031	5635,0
*apolar **polar ácido ***polar neutro ****polar básico			

Em relação ao subsítio S'_2 , o substrato contendo Ala em P'_2 apresentou a melhor eficiência catalítica de $430820 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ para a série estudada e entre todos as séries, assim como maior afinidade com K_M de $0,0001 \text{ mM}$. Neste subsítio ocorreu a hidrólise de todos os substratos estudados, entretanto a alta eficiência catalítica indica uma especificidade para o aminoácido Ala de característica apolar (Tabela 9).

Tabela 9. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S'_2 , utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P'_2 , nas condições de ensaio a 40°C em pH 6,0.

Substrato	$k_{\text{cat}}(\text{s})$	$K_M(\mu\text{M}) \times 10^{-3}$	$k_{\text{cat}}/K_M(\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1})$
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
*Abz-KLRSAKQ-EDDnp	39,1	0,0001	430819,8
***Abz-KLRSNKQ-EDDnp	5,8	0,0002	32356,7
****Abz-KLRSLKQ-EDDnp	71,6	0,0026	27657,2
***Abz-KLRSYKQ-EDDnp	43,5	0,0018	24261,7
*Abz-KLRSIKQ-EDDnp	14,5	0,0007	22231,3
*Abz-KLRSEKQ-EDDnp	3,9	0,0002	21145,6
*Abz-KLRSMKQ-EDDnp	23,8	0,0012	20142,1
***Abz-KLRQKQ-EDDnp	3,9	0,0002	18421,4
**Abz-KLRSEKQ-EDDnp	9,2	0,0006	14214,9
****Abz-KLRSRKQ-EDDnp	8,0	0,0006	12960,8
*Abz-KLRSVKQ-EDDnp	16,2	0,0013	12444,7
****Abz-KLRSKKQ-EDDnp	6,0	0,0006	10385,4
*Abz-KLRSWKQ-EDDnp	7,2	0,0008	8870,2
*Abz-KLRSPKQ-EDDnp	10,1	0,0014	6953,3
*Abz-KLRSGKQ-EDDnp	7,8	0,0013	6019,2
**Abz-KLRSDKQ-EDDnp	20,0	0,0035	5707,5
****Abz-KLRSHKQ-EDDnp	3,7	0,0008	4468,6

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

No subsítio S'_3 , o substrato contendo Leu em P'_3 apresentou a melhor eficiência catalítica de $62180 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ seguido de Val com $43550 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. A maiores afinidade foi identificada para o aminoácido Leu com K_M de $0,0001 \text{ mM}$. Neste subsítio as maiores eficiências catalíticas estão relacionadas a aminoácidos apolares na posição P'_3 . Não houve hidrólise de aminoácidos com Asp, Pro e Tyr nesta posição (Tabela 10).

Tabela 10. Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Scopulariopsis koningii* do subsítio S'₃, utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições na posição P'₃, nas condições de ensaio a 40 °C em pH 6,0.

Substrato	k _{cat} (s)	K _M (μM) x10 ⁻³	k _{cat} /K _M (s ⁻¹ · μM ⁻¹)
****Abz-KLRSSKQ-EDDnp	17,7	0,0026	6842,0
*Abz-KLRSSLQ-EDDnp	5,2	0,0001	62179,6
*Abz-KLRSSVQ-EDDnp	14,7	0,0003	43550,3
*Abz-KLRSSFQ-EDDnp	43,6	0,0013	34468,1
*Abz-KLRSSIQ-EDDnp	42,8	0,0014	30062,2
*Abz-KLRSSWQ-EDDnp	17,2	0,0007	26229,8
***Abz-KLRSSMQ-EDDnp	15,8	0,0007	22178,8
*Abz-KLRSSAQ-EDDnp	48,6	0,0025	19712,3
***Abz-KLRSSSQ-EDDnp	45,4	0,0024	18717,3
****Abz-KLRSSHQ-EDDnp	11,3	0,0006	18341,3
***Abz-KLRSSQ-EDDnp	17,5	0,0010	17169,5
****Abz-KLRSSRQ-EDDnp	34,0	0,0020	16626,8
**Abz-KLRSEQ-EDDnp	22,6	0,0015	15389,7
***Abz-KLRSSSTQ-EDDnp	12,4	0,0012	10654,1
*Abz-KLRSSGQ-EDDnp	21,9	0,0023	9571,8
**Abz-KLRSSDQ-EDDnp		Não hidrolisa	
*Abz-KLRSSPQ-EDDnp		Não hidrolisa	
***Abz-KLRSSYQ-EDDnp		Não hidrolisa	

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

Do lado linha, ou seja, P'₁, P'₂ e P'₃ o subsítio que apresentou os maiores valores de eficiência catalítica e melhor afinidade foi o subsítio S'₃, quando a posição P'₃ do substrato era ocupada por um aminoácido de cadeia apolar alifática. Nota-se que em todos os subsítios analisados, a peptidase possui elevada preferência por aminoácidos com cadeias laterais apolares alifáticas nas posições P'₁, P'₂ e P'₃.

Assim como ocorreu com o lado não linha, aminoácidos com cadeias laterais carregadas negativamente não foram bem aceitos em qualquer um dos três subsítios, apresentando baixa eficiência catalítica, apesar da alta afinidade apresentada quando glutamato estava na posição P'₂.

4.6. Liofilização

A estabilidade das micropartículas foi avaliada em função da atividade específica das micropartículas nos tempos, 0, 7, 18 e 32 dias, após o processo de liofilização.

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

A figura 23 apresenta a atividade relativa das micropartículas com adição dos adjuvantes e o controle é o extrato bruto liofilizado sem adição de adjuvantes. O material foi estocado durante 32 dias a 4 °C.

Conforme podemos observar, atividade do controle manteve-se em queda com o passar dos dias de armazenamento, sendo que, após 32 dias de armazenamento, o controle manteve-se com aproximadamente 70% de sua atividade proteolítica, já a amostra contendo maltodextrina na concentração de 2,5% manteve praticamente 100% da atividade proteolítica das peptidases presentes no extrato enzimático.

Figura 23. Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii* liofilizadas. O armazenamento foi realizado durante os períodos de 0, 07, 18 e 32 dias a 4 °C. M – Manitol; G – Glicina; MD – Maltodextrina.

Com esses resultados podemos inferir que, a quantidade de adjuvante no processo de liofilização é importante na manutenção da atividade proteolítica das enzimas liofilizadas quando armazenadas a 4 °C.

Na figura 24, apresentamos os resultados da estabilidade das micropartículas quando armazenadas em temperatura de 25 °C.

Figura 24. Estabilidade das peptidases, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii* liofilizadas. O armazenamento foi realizado durante os períodos de 0, 07, 18 e 32 dias a 25 °C. M – Manitol; G – Glicina; MD – Maltodextrina.

Após análise do gráfico, foi possível observar que, assim como na temperatura de 4°C, atividade proteolítica do experimento controle manteve-se em queda com o passar dos dias de armazenamento, sendo que após 32 dias de armazenamento, o controle manteve-se com apenas 53% de sua atividade proteolítica, já a amostra contendo maltodextrina na concentração de 4,5% manteve cerca de 93% da atividade proteolítica das enzimas presentes no extrato bruto.

A figura 25 mostra o perfil de estabilidade das micropartículas na temperatura de 60°C. Essa análise teve a finalidade de demonstrar a estabilidade acelerada das micropartículas obtidas no processo de liofilização. Após análise, é possível observar novamente a importância da presença dos adjuvantes durante o processo de liofilização, em especial nesse estudo, do adjuvante maltodextrina nas concentrações de 2,5 e 4,5% que mantiveram cerca de 64 e 75% da atividade proteolítica das peptidases presentes no extrato bruto liofilizado após 32 dias, respectivamente, enquanto o controle manteve-se com cerca de 45% de sua atividade proteolítica.

Figura 25. Estabilidade acelerada das peptidases, produzidas pelo fungo *Scopulariopsis koningii* liofilizadas. O armazenamento foi realizado durante os períodos de 0, 07, 18 e 32 dias a 60 °C. M – Manitol; G – Glicina; MD – Maltodextrina.

O mecanismo de proteção proteica por diversos adjuvantes esta relacionada com a formação vítrea no estado sólido, outro efeito da adição de adjuvantes é o efeito de “diluição”, o qual vai reduzir a possibilidade das moléculas proteicas interagirem umas com as outras formando aglomerado, ação que pode ocorrer também no estado sólido. Uma das principais funções da maltodextrina é fortalecer a matriz vítrea e melhorar a estabilidade do pó (NAMALDI et al., 2006). De acordo com a literatura, pode-se dizer que a utilização de carboidratos e alguns aminoácidos, como a glicina utilizada nesse estudo, na estabilização de proteínas possa protegê-las devido à formação de ligações de hidrogênio com o produto seco servindo como um substituinte da água quando a hidratação da proteína é removida (CARPENTER e CROWE, 1984; NAMALDI et al., 2006; SILVA, 2010).

O manitol também foi utilizado na manutenção da atividade enzimática frente à temperatura, visto que os polióis têm a capacidade de formar pontes de hidrogênio que possuem um papel fundamental na manutenção da conformação nativa e estabilização da proteína (KHANDEPARKAR et al., 2006).

O estudo da estabilidade do extrato enzimático liofilizado mostrou que, dependendo da aplicação enzimática, todos os adjuvantes foram capazes de promover uma relativa proteção térmica. Considerando a temperatura ambiente como a de menor gasto energético, consequentemente mais rentável economicamente, e que o rendimento da liofilização para

todos os adjuvantes em todas as concentrações foi de 80% figura 26, o adjuvante considerado mais eficaz foi a maltodextrina na concentração de 4,5% que manteve cerca de 93% da atividade do extrato enzimático liofilizado por 32 dias (figura 24).

Figura 26: Rendimento da liofilização do extrato bruto obtido no bioprocesso submerso pelo fungo *S. koningii*.

5. CONCLUSÕES

As grandes inovações virão não apenas como consequência do desenvolvimento de novas enzimas, mas também, como resposta a ajustes na metodologia de uso das atuais enzimas, passando a ser obtidas a partir de outros microrganismos ou novos processos de cultivo dos mesmos.

É importante o aprimoramento das metodologias utilizadas para otimizar a produção de enzimas de interesse industrial para o processo se tornar o mais rentável possível e produzir quantidades significativas de peptidase. Para tal, o presente trabalho visou a produção de peptidase pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, utilizando o substrato farinha de pena. O fungo possui potencial para secretar peptidases de interesse industrial, além de ser facilmente manipulável, de baixa esporulação e crescimento rápido em meio de cultura barato como PDA. Em relação ao substrato, além de economicamente viável, contém alto teor de proteínas em sua composição e foi capaz de estimular a produção de peptidase sem a necessidade de suplementação com outras fontes de nitrogênio e carbono.

O extrato enzimático obtido no bioprocessamento submerso apresentou como condições ótimas pH 6,5 e temperatura 55°C. O perfil de inibição sugere a presença de serino e metalo peptidases e os íons apresentaram capacidade de modular positiva e negativamente a atividade proteolítica do extrato enzimático concentrado.

A purificação do extrato enzimático se mostra promissora, sendo que já foi estabelecido um protocolo para a purificação da metalo peptidase, e para a purificação da serino peptidase, a metodologia poderá ser desenvolvida em trabalhos futuros.

A metalo peptidase purificada foi caracterizada utilizando os substratos com supressão intramolecular de fluorescência, pois permitem o monitoramento da reação de forma contínua, proporcionando um método prático e rápido para a determinação da atividade enzimática. A enzima apresentou como condições ótimas pH 6,0 e temperatura 40°C e obteve boa estabilidade em ampla faixa de pH (5 a 9,5) e temperatura (25 a 45°C) mantendo cerca de 90% da atividade proteolítica. A peptidase foi modulada positivamente por íons monovalentes positivos (Li^+ , Na^+ e K^+) e modulada negativamente, principalmente, por íons divalentes positivos, como zinco e cobre. A inibição por EDTA e o inibidor específico de metalo peptidase, fosforomidon, corroborou com a hipótese da presença de uma metalo peptidase no extrato enzimático bruto obtido pelo bioprocessamento submerso. Dentre os surfactantes analisados, SDS proporcionou uma ativação de aproximadamente 30% na atividade proteolítica na

concentração de 0,005%, enquanto que na presença de CTBA a atividade residual foi cerca de 20%.

As enzimas proteolíticas têm um papel fundamental em muitos processos biológicos. Por isso, o estudo da especificidade das peptidases pode ser importante para uma melhor compreensão da função destas enzimas e para o desenvolvimento de inibidores. Para tal, o presente estudo utilizou os substratos com supressão intramolecular de fluorescência. Foram analisados os subsítios S_1 , S_2 , S_3 , S'_3 , S'_2 e S'_1 . Aminoácidos com cadeias laterais apolares alifáticas e polares não carregados proporcionaram a maior eficiência catalítica da peptidase quando inseridos nas posições P_2 e P'_3 do substrato, respectivamente. A maior afinidade, ou seja, menor valor de K_M , foi obtida no subsítio S'_3 na presença do aminoácido leucina na posição correspondente.

O processo de liofilização obteve rendimento aceitável e os resultados de estabilidade sugerem a possibilidade de acondicionamento do extrato enzimático em pó na temperatura de 25°C, porém, é necessário um estudo mais amplo em relação à estabilidade para concluir a meia vida do extrato, sendo possível, dessa forma, estabelecer um prazo de validade no caso de uma futura aplicação industrial.

6. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001 p.405-412.
- ANBU, P.; Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Lakshmipriya, T.; Annadurai, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, Inglaterra, v.98, p.1298-1303, 2007.
- ANITHA, T.S.; PALANIVELU, P. Production and characterization of keratinolytic protease(s) from the fungus *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v.2, n.2, p.87-93, 2012.
- ARAÚJO, A. J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M. P.; OLIVEIRA, J. C. Onicomicose por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n.445-455, 2003.
- BALAJI, S.; SENTHIL, K. M.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. K.. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v.24, p.2741–2745, 2008.
- BALLESTÉ, R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomicosis. Revisión del tema. **Revista Médica de Uruguay**, v.19, p.93-106. 2003.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.204, n.2, p.433-451, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- CARPENTER, J. F.; IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives, *Freezing-Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, edited by Louis Rey, 1999.

CARPENTER, J.; CROWE, J.H. An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, New York, v.28, p.3916-3922, 1984.

CAVALLERA, E.; ASBATI, M. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatófitos. **Dermatol Venez**, v.44, p.4-10, 2006

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

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CRAIK, C. S.; SPRANG, S.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W. Intron-exon splice junctions map at protein surfaces. **Nature**, v.299, n.5879, p.180-182, 1982.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial**, Zaragoza Acribia, p.413, 1993.

DIENES, D.; BORJESSON, J.; HAGGLUND, P.; TJERNELD, F.; LIDEN, G.; RECZEY, K. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p.1087–94, 2007.

DRUCKER, H. Regulation of exocellular peptidases in *Neurospora crassa*: metabolic requirements of the process. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.122, p.1117–1125, 1975.

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

DUNAEVSKY, Y.E.; MATVEEVA, A.R.; BELIAKOVA, G.A.; DOMASH, V.I.; BELOZERSKY, M.A. Extracellular alkaline proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry**, Moscow, v.72, p.345–50, 2007.

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

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.1, p.78-85, jan. 1991.

EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESSA, B.; CARUPT, P. A. Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. **Journal of Pharmaceutical Science**, Hoboken, v.80, n.8, p.744-749, ago. 1991.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, Elmsford, v.36, p.1039-1051, 1998.

FERNANDES, B.L.; ANEAS, M.A.F.; JULIANO, L.; PALMA, M.S.; LEBRUN, I.; PORTARO, F.C.V. Development of an operational substrate for ZapA, a metalloprotease secreted by the bacterium *Proteus mirabilis*. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v.33, p.765–70, 2000.

GHORBEL, B.; KAMOUN, A.S.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, p.513-518, 2003.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.20, n.1, p.17-48, 2000.

GIONGO, J.L. **Caracterização e aplicação de peptidases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 95p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. 2006.

GODFREY, T.; S.WEST. **Industrial enzymology**, 2. ed. New York: Macmillan Publishers Inc, 1996, p.609.

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

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

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts: an introduction**, Berlin: Springer Verlag, 1988.

HATANAKA, T.; UESUGI, J.A.Y.; IWABUCHI, M. Purification, characterization cloning, and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. Arch. **Biochimica et Biophysica**, Amsterdam, v.434, p.289–298, 2005.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELLO, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v.27, p.270-278, 2000.

ITO, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. Use of snake as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharmaceutical Research**, New York, v.7, n.10, p.1042-1047, out. 1990.

KHANDEPARKAR, R.D.S.; BHOSLE, N.B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 521 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v.39, n.4, p.732-742, 2006.

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

KRAUT, J. Serine-peptidases - structure and mechanism of catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.46, p.331-358, Jul. 1977.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline peptidases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, New York, v.17, p.561–594, 1999.

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

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHIMIDELL, W. Produção de Enzimas Microbianas. **Biotecnologia Industrial**: volume 2 e 4; 1ª edição. São Paulo, 2001.

LOUIS, D.; BERNILLON, J.; PAISSE, J.O.; WALLACH, J.M. Use of a liquid chromatography–mass spectrometry coupling for monitoring the serralysin-catalyzed hydrolysis of a peptide library. **Journal of Chromatography B.**, Amsterdam, v.732, p.271–6, 1999.

MAEDA, H.; MORIHARA, K. Serralysin and related bacterial proteinases. **Methods in enzymology Academic Press**, London, v.248, p.395–413, 1995.

MAHAJAN, R.T.; BADGUJAR, S.B. “Biological aspects of proteolytic enzymes: a review,” **Journal of Pharmacy Research**, v.3, n.9, p.2048–2068, 2010.

MARCHISIO, F.V. *Keratinophilic fungi*: their role in nature and degradation of keratinic substrates. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, p.86–92, 2000.

MAURER, K.H. Detergents peptidases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, n.3, p.330-334, ago. 2004.

MEEVOOTISOM, V., NIEDERPRUEM, D.J., 1979. Control of extracellular peptidases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.17, p.91–106, 1979.

MENDONÇA, E.G. **Propriedades bioquímicas e cinetico-enzimáticas de cisteino-peptidases do intestino médio de largata da soja**. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2008.

MOREIRA, F.G.; SOUZA, C.G.M.; COSTA, M.A.; REIS, S.; PERALTA, R.M. Degradation of chicken feathers by *Myrothecium verrucaria*. **Mycopathologia**, Holanda, 2006.

MORIHARA, K.; ODA, K. Microbial degradation of proteins. In: GUENTHER, W. (Ed.). Microbial degradation of natural products. **Weinheim**, Germany: VCH Publishers, 1993. p.293-364.

MUHSIN, T.M., HADI, R.B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Mycopathologia**, Holanda, v.154, p.185–189, 2002.

NAMALDI, A.; CALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying Temperature and additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, New York, v.24, p.1495-1500, 2006.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes- a practical approach**, Oxford: JRL Press, p.259, 1990.

NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam, P.S.; Pandey, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**, Springer Science+ Business Media, 2009.

PATEL, R.N. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.31, n.6, p.804-826, nov.2002.

PEKKARINEN, A.I.; JONES, B.L.; NIKU-PAAVOLA, M. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v.269, p.798–807, 2002.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipasecatalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activatedbleaching earth. **Process Biochemistry**, London, v.38, n.7, p.1077-1082, fev.2003.

QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.

RAMNANI, P., GUPTA, R.. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.40, p.191–196, 2004.

RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANGE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, p.597-665. 1998.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v.290, p.205-218, 1993.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J., Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, London, p.205-18, 1993.

RIES, S.M.; ALBERSHEIM, P. Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.63, p.625-629, 1973.

RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.128, p.693-703, 2007.

SANT'ANNA JUNIOR, G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p.351-362.

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

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

SAREEN, R.; MISHRA, P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-3. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.79, p.399-405, 2008.

SATOSHI, U.; NORIAKI, I. Partial purification and characterization of pro-phospholipase A2 activating peptidases from gill membranes of the red sea bream, *crysophrys major*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, New York, v.141, p.121-127, 2005.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 27, p. 157-162, 1967.

SCRIBAN, R. **Biotecnologia**. São Paulo: Manole, p.489, 1985.

SEN, S., SATYANARAYANA, T., 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S40. **Journal of Microbiology**, v.33, p.43-47, 1993.

SILVA, T.A.C. **Caracterização bioquímica e secagem em "spray dryer" de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2010.

SIM, Y.C.; NAM, Y.S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, Berlin, v.58, n.4, p.252-256, abr. 2003.

SINGH, C.J. Exocellular peptidases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. **Mycopathologia**, Holanda, v.143, p.147-150, 1998.

SUMANTHA, A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, p.313–319, 2005.

THYS, R.C.S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium* SP-kr10**. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2004

TOMÉ, R.; MARQUES, G. Gresmine. In: TOMÉ, R. Atlas Micologia. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com.br/search/label/Scopulariopsis>>. Acesso em 12 de dez. 2013.

TOWNS, J.K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.705, p.115-127, 1995.

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.

TREVAN, M.D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K.H.; STANBURY, P. **Biotecnologia: Princípios biológicos**, Espanha, Zaragoza: Acribia, p.284, 1990.

UNITED States Pharmacopeia. General Chapter. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeical Convention, p.2481, 2005.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, Moscow, v.69, n.11, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VERMELHO, A. B. et al. **Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas**. In: Elba P.S.Bon; Maria Antonieta Ferrara; Maria Luísa Corvo. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.

VITOLO, M. 2001. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). **Biotecnologia na produção de alimentos**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p.387-420, 2001.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, **International Journal of Pharmaceuticals**, v.203, p.1-60, 2000.

WARD, O.P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. **Applied Science Publishers**, London, p.251-305, 1983.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme Biotechnology**, New York: John Wiley Sons, 1985.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**, Espanha, Zaragoza: Acribia, p.444, 1991.

ZANPHORLIN, L.M.; CABRAL H.; ARANTES E.; ASSIS, D.; JULIANO L.; JULIANO M.A.; DA-SILVA R.; GOMES E.; BONILLA-RODRIGUEZ G.O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, London, v.46, p.2137–2143, 2011.