



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Ronivaldo Rodrigues da Silva

Estudo comparativo das características bioquímicas funcionais
e especificidade catalítica de aspartil, cisteíno e serino
peptidases fúngicas

São José do Rio Preto
Fevereiro, 2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Estudo comparativo das características bioquímicas funcionais
e especificidade catalítica de aspartil, cisteíno e serino
peptidases fúngicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

São José do Rio Preto
Fevereiro, 2016

Silva, Ronivaldo Rodrigues da.

Estudo comparativo das características bioquímicas funcionais e especificidade catalítica de aspartil, cisteíno e serino peptidases fúngicas / Ronivaldo Rodrigues da Silva. – São José do Rio Preto, 2016

114 f. : il., tabs.

Orientador: Hamilton Cabral

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos– Aplicações industriais. 3. Fungos filamentosos. 4. Endopeptidases. 5. Bioquímica – Análise. 6. Substratos fluorogênicos. I. Cabral, Hamilton.

II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Ronivaldo Rodrigues da Silva

Estudo comparativo das características bioquímicas funcionais
e especificidade catalítica de aspartil, cisteíno e serino
peptidases fúngicas

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Hamilton Cabral
FCFRP – USP/Ribeirão Preto
Orientador

Prof^a. Dra. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luis Henrique Souza Guimarães
FFCLRP – USP/Ribeirão Preto

Prof^a. Dra. Fernanda Canduri
IQSC – USP/São Carlos

Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice
CIIB - Universidade de Mogi das Cruzes

São José do Rio Preto
Fevereiro, 2016

Dedico este trabalho aos meus pais, demais familiares e amigos que sempre me apoiaram e contribuíram para realização deste projeto. Obrigado a todos!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, primeiramente a Deus, por me dar força e permitir que todo este projeto pudesse ser realizado.

Agradeço aos meus pais e toda família, os quais são minha fortaleza e inspiração pra não desistir.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral que acreditou em meu trabalho e possibilitou a realização deste projeto, orientando e dando o suporte acadêmico necessário.

Agradeço ao Prof. Dr. Fabio Renato Lombardi, Prof^a. Maria Luíza Salioni e Prof^a. Dra Eleni Gomes que também são responsáveis pela minha trajetória científico/acadêmica.

Aos amigos Ana Claudia, Gabriel, Juliana, Luciana, Nathalia, Rafael, Sandra, Tatiane e Youssef que contribuíram diretamente na realização deste trabalho, sendo partes integrantes na minha vida pessoal e científica.

Aos membros de minha banca de qualificação, Prof. Dr. Roberto da Silva e Gustavo O. B. Rodriguez. Aos membros da banca de defesa de doutorado, Prof^a Dra. Eleni Gomes, Prof^a Dra. Fernanda Canduri, Prof. Dr. Luis Henrique S. Guimarães e Prof. Dr. Wagner A. S. Júdice. Agradeço a todos pelo tempo dedicado na leitura deste trabalho e por todas as contribuições realizadas.

Agradeço as Agências financiadoras deste projeto, FAPESP, CNPq e CAPES pelo provimento da bolsa de pesquisa de doutorado.

RESUMO

Aspártico (E.C. 3.4.23), cisteíno (E.C. 3.4.22) e serino peptidases (E.C. 3.4.21) são endopeptidases, cujos modos de ação são dependentes de resíduos de ácido aspártico, cisteína e serina presentes no sítio catalítico, respectivamente. Atualmente, vários estudos são realizados na busca por novas enzimas com relevantes propriedades bioquímicas para aplicação industrial. Neste contexto, nós propomos a produção de enzimas em bioprocessos submersos, purificação, estudo das propriedades bioquímicas e determinação da especificidade catalítica das peptidases secretadas pelos fungos filamentosos *Rhizomucor miehei*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp. Inicialmente, após produção por bioprocessos submersos, estas enzimas foram purificadas utilizando cromatografias de exclusão molecular e troca iônica. Em ensaios de inibidores na atividade enzimática, notamos inibição das peptidases por pepstatina A (*R. miehei*), ácido iodoacético/N-Etilmaleimida (*P. chrysosporium*) e fluoreto de fenil metil sulfonila (*Leptosphaeria* sp), sendo então definidas como aspártico, cisteíno e serino peptidases, respectivamente. Por SDS-PAGE (12%), as massas moleculares foram estimadas em 37 kDa (aspártico), 23 kDa (cisteíno) e 35 kDa (serino). O máximo de atividade proteolítica foi alcançado em pH 5,5 e 55 °C para peptidase aspártica secretada por *R. miehei*; pH 7 e faixa de temperatura 45-55 °C para cisteíno peptidase secretada por *P. chrysosporium*, e pH 7 e 45 °C para serino peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. Sob efeito de incubação a diferentes pH, a peptidase aspártica mostrou-se estável em condições ácidas (pH 3-5); cisteíno peptidase foi estável em ampla faixa de pH (pH 4-9), e serino peptidase mostrou-se mais estável em condições com tendências alcalinas e pH ligeiramente ácido (pH 5-9). Em todas estas faixas de pH citadas, as peptidases apresentaram atividade proteolítica acima de 80% por 1 hora de incubação. Quanto à estabilidade térmica, a cisteíno peptidase mostrou-se mais termoestável dentre as três enzimas e serino peptidase descreveu a menor tolerância à temperatura. Em incubação com agentes desnaturantes, observamos redução na atividade proteolítica sob efeito de surfactantes iônicos (0,02-1%): dodecil sulfato de sódio (SDS) e brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB); íon cobre II (5 mM); Ditioneitol (DTT) e guanidina (ambos na faixa de 10-200 mM) para todas as peptidases. Por último, em estudo de especificidade catalítica destas enzimas, observamos a preferência por aminoácidos aromáticos (F e W), básicos (K e R) e apolares (em particular, resíduo de metionina) para peptidase aspártica. Alta especificidade descrita por cisteíno peptidase, cuja preferência catalítica é notória por aminoácidos básicos (K, H e R), especialmente na posição P₃ e lisina-dependência para catálise na posição P₃. Em serino peptidase, notamos maior aceitação por aminoácidos apolares (G, I, L, M e V), básicos (H e R) e polares neutros (N e Q) para as diferentes posições avaliadas no substrato.

Palavras chaves: Aspártico peptidase, Cisteíno peptidase, Serino peptidase, Substrato de supressão intramolecular de fluorescência, *Rhizomucor miehei*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp.

ABSTRACT

Aspartic (EC 3.4.23), cysteine (EC 3.4.22) and serine peptidases (EC 3.4.21) are endopeptidases whose modes of action are dependent on aspartic acid, cysteine and serine residues present in the catalytic site, respectively. Currently, several studies are conducted in the search for new enzymes with relevant biochemical properties for industrial application. In this context, we propose the production of enzymes in submerged bioprocess, purification, the study of biochemical properties and determining the catalytic specificity peptidases secreted by the filamentous fungus *Rhizomucor miehei*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Leptosphaeria* sp. Initially, after production submerged bioprocess, these enzymes have been purified using size-exclusion and ion exchange chromatographies. In the effect of inhibitors on enzyme activity, we note peptidase inhibition by pepstatin A (*R. miehei*), iodoacetic acid/ N-Ethylmaleimide (*P. chrysosporium*) and phenyl methyl sulfonyl fluoride (*Leptosphaeria* sp), suggesting that these enzymes are aspartic, cysteine and serine peptidases, respectively. For SDS-PAGE (12%), molecular weights were estimated at 37 kDa (aspartic), 23 kDa (cysteine) and 35 kDa (serine). Maximum proteolytic activity was achieved at pH 5.5 and 55 °C for aspartic peptidase secreted by *R. miehei*; pH 7 and temperature range 45-55 °C for cysteine peptidase secreted by *P. chrysosporium* and pH 7 and 45 °C for serine peptidase secreted by *Leptosphaeria* sp. Under incubation at different pH effect, aspartic peptidase was stable under acidic conditions (pH 3-5); cysteine peptidase was stable in wide pH range (pH 4-9), and serine peptidase was more stable under alkaline conditions and pH slightly acidic (pH 5-9). In all these pH ranges mentioned, peptidases showed proteolytic activity above 80% by 1 hour incubation. As regards the thermal stability, cysteine peptidase was more thermostable enzyme and serine peptidase described the lowest temperature tolerance. In incubation with denaturing agents, we observed a decrease in proteolytic activity under the effect of ionic surfactant (0.02-1%) sodium dodecyl sulfate (SDS) bromide and cetyl-trimethyl ammonium bromide (CTAB); copper (II) ion (5 mM); Dithiothreitol (DTT) and guanidine (both in the range of 10-200 mM) for all peptidases. Finally, the study of catalytic specificity of these enzymes, we found a preference for aromatic amino acids (F and W), basic (K and R) and nonpolar (in particular, methionine residue) to aspartic peptidase. High specificity described by cysteine peptidase, which a catalytic preference is notorious for basic amino acids (K, R and H), especially in position P_3 and lysine-dependence for catalysis at position P'_3 . In serine peptidase, for different evaluated positions, we noticed greater acceptance by nonpolar amino acids (G, I, L, M and V), basic (M and R) and neutral polar (N and Q).

Key words: Aspartic peptidase, Cysteine peptidase, Serine peptidase, Intramolecularly quenched fluorogenic substrates, *Rhizomucor miehei*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Leptosphaeria* sp.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismo de ação de peptidases..... | 21 |
| Figura 2. Modelo de sítio ativo de uma peptidase..... | 27 |
| Figura 3. Fluxograma de metodologia sobre estudo de peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 35 |
| Figura 4. Fluxograma de metodologia sobre estudo de peptidases secretadas por <i>P. chrysosporium</i> e <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 37 |
| Figura 5. Modelo esquemático de substrato FRET durante a catálise enzimática..... | 38 |
| Figura 6. Cromatograma em resina Sephadex G-50, extrato BSm do fungo <i>R. miehei</i> | 41 |
| Figura 7. Cromatograma em resina Sephacryl S-100, amostra do fungo <i>R. miehei</i> | 42 |
| Figura 8. SDS-PAGE. Peptidase pura secretada pelo fungo <i>R. miehei</i> | 43 |
| Figura 9. Efeito de pH na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 44 |
| Figura 10. Efeito de temperatura na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 45 |
| Figura 11. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 46 |
| Figura 12. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 47 |
| Figura 13. Efeito de surfactantes sobre a atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 50 |
| Figura 14. Efeito de DTT, guanidina e ureia sobre a atividade da peptidase aspártica secretada por <i>R. miehei</i> | 51 |
| Figura 15. Especificidade da peptidase aspártica: P ₁ (A), P ₂ (B) e P ₃ (C)..... | 52 |
| Figura 16. Especificidade da peptidase aspártica: P' ₁ (A), P' ₂ (B) e P' ₃ (C)..... | 53 |
| Figura 17. Cromatograma em resina Sephadex G-50, extrato BSm do fungo <i>P. chrysosporium</i> | 55 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Cromatograma em resina catiônica Source 15S, amostra do fungo <i>P. chrysosporium</i> | 56 |
| Figura 19. SDS-PAGE. Peptidase pura secretada pelo fungo <i>P. chrysosporium</i> | 57 |
| Figura 20. Efeito de pH sobre a atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 58 |
| Figura 21. Efeito de temperatura na atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 59 |
| Figura 22. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 60 |
| Figura 23. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 61 |
| Figura 24. Efeito de surfactantes sobre a atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 64 |
| Figura 25. Efeito de DTT, guanidina e ureia sobre a atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 65 |
| Figura 26. Especificidade da cisteíno peptidase: P ₁ (A), P ₂ (B) e P ₃ (C)..... | 67 |
| Figura 27. Especificidade da cisteíno peptidase: P' ₁ (A), P' ₂ (B) e P' ₃ (C)..... | 68 |
| Figura 28. Cromatograma em resina Sephadex G-50, extrato BSm do fungo <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 70 |
| Figura 29. Cromatograma em resina catiônica Source 15S, amostra do fungo <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 71 |
| Figura 30. SDS-PAGE. Peptidase pura secretada pelo fungo <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 72 |
| Figura 31. Efeito de pH sobre a atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 73 |
| Figura 32. Efeito de temperatura sobre a atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 74 |
| Figura 33. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 75 |
| Figura 34. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 76 |

| | |
|---|----|
| Figura 35. Efeito de surfactantes sobre a atividade da serino peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 79 |
| Figura 36. Efeito de DTT, guanidina e ureia sobre a atividade da serino peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 80 |
| Figura 37. Especificidade da serino peptidase: P ₁ (A), P ₂ (B) e P ₃ (C)..... | 82 |
| Figura 38. Especificidade da serino peptidase: P' ₁ (A), P' ₂ (B) e P' ₃ (C)..... | 84 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Sumário de purificação da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 43 |
| Tabela 2. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 48 |
| Tabela 3. Efeito de íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 49 |
| Tabela 4. Sumário de purificação da peptidase secretada por <i>P. chryso sporium</i> | 57 |
| Tabela 5. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por <i>P. chryso sporium</i> | 62 |
| Tabela 6. Efeito de íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>P. chryso sporium</i> | 63 |
| Tabela 7. Sumário de purificação da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 72 |
| Tabela 8. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 77 |
| Tabela 9. Efeito de íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 78 |

Abreviações dos aminoácidos

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

Outras Abreviações Utilizadas

| | |
|----------------|--|
| λ_{em} | Comprimento de onda de emissão |
| λ_{ex} | Comprimento de onda de excitação |
| Abz | Ortho-aminobenzoic acid (Ácido orto-aminobenzóico) |
| AIA | Ácido iodoacético |
| BSm | Bioprocesso submerso |
| CTAB | Cetyl trimethylammonium bromide (Brometo de cetil-trimetilamônio) |
| DTT | Dithiothreitol (Ditiotreitol) |
| EDDnp | N-2,4-dinitrophenyl ethylenediamine (N-2,4- dinitrofenil-etilenodiamino) |
| EDTA | Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiamino tetra-acético) |
| FRET | Fluorescence resonance energy transfer (Transferência de energia de ressonância por Fluorescência) |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl fluoride (Fluoreto de fenil-metil-sulfonila) |
| NEM | N-Ethylmaleimide (N-Etilmaleimida) |
| SDS | Sodium dodecyl sulfate (Dodecil sulfato de sódio) |
| SDS-PAGE | Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio) |
| TCA | Trichloroacetic acid (Ácido tricloroacético) |
| U/mL | Unidade de Atividade/mL |
| UV | Ultravioleta |
| TRITON X-100 | 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol (4-(1,1,3,3 –Tetrametil-butil) fenil-polietileno glicol) |
| TWEEN 20 | Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Monolaurato de polioxietileno sorbitano) |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1 Micro-organismo e potencial de aplicação..... | 18 |
| 2.2 Enzimas fúngicas meso e termofílicas..... | 19 |
| 2.3 Peptidases | 20 |
| 2.3.1 Peptidases aspárticas | 22 |
| 2.3.2 Cisteíno peptidases..... | 23 |
| 2.3.3 Serino peptidases..... | 24 |
| 2.3.4 Metalo peptidase..... | 24 |
| 2.3.5 Treonino peptidases..... | 25 |
| 2.3.6 Glutâmico peptidases..... | 25 |
| 2.4 Especificidade das peptidases..... | 27 |
| 2.5 Aplicações de peptidases..... | 28 |
| 3. OBJETIVOS..... | 31 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 Micro-organismos e meio de manutenção..... | 32 |
| 4.2 Bioprocesso submerso (BSm)..... | 32 |
| 4.3 Quantificação de proteína total..... | 33 |
| 4.4 Determinação da atividade proteolítica e concentração do extrato enzimático bruto..... | 33 |
| 4.5 Etapas cromatográficas..... | 34 |
| 4.5.1 Peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 34 |
| 4.5.2 Purificação das peptidases secretadas pelos fungos <i>P. chrysosporium</i> e <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 35 |
| 4.6 Caracterização bioquímica funcional das peptidases..... | 37 |

| | |
|--|----|
| 4.6.1 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases..... | 38 |
| 4.6.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade das peptidases..... | 39 |
| 4.6.3 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade das peptidases..... | 39 |
| 4.6.4 Determinação da concentração molar e especificidade das peptidases..... | 40 |
| 5. RESULTADOS | 41 |
| 5.1 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso <i>R. miehei</i> | 41 |
| 5.1.1 Purificação..... | 41 |
| 5.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 44 |
| 5.1.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 47 |
| 5.1.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 49 |
| 5.1.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por <i>R. miehei</i> | 51 |
| 5.2 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso <i>P. chrysosporium</i> | 55 |
| 5.2.1 Purificação | 55 |
| 5.2.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 58 |
| 5.2.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 62 |
| 5.2.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 63 |
| 5.2.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por <i>P. chrysosporium</i> | 66 |
| 5.3 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 70 |
| 5.3.1 Purificação | 70 |

| | |
|---|-----|
| 5.3.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 73 |
| 5.3.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 76 |
| 5.3.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 78 |
| 5.3.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por <i>Leptosphaeria</i> sp..... | 80 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 85 |
| 7. CONCLUSÃO..... | 93 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |
| APÊNDICES..... | 103 |

1. INTRODUÇÃO

A indústria biotecnológica tem se expandido em todo o mundo. Neste contexto, a produção de enzimas é um ramo importante e tem possibilitado grandes lucros econômicos. No cenário mundial, o mercado de enzimas tem movimentado bilhões de dólares anualmente e pesquisas nesta área tem possibilitado um crescente número de patentes e artigos científicos publicados (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al, 2003). Contudo, em relação a outros países, os investimentos brasileiros em pesquisa e desenvolvimento ainda estão abaixo de um nível satisfatório (BIANCHI, 2013).

Em pesquisas atuais, independente das finalidades do produto gerado (metabólitos), a preferência no uso de micro-organismos na sua obtenção é justificada pela maior facilidade de manuseio, diversidade de espécies, habilidade de secreção celular, capacidade de degradação de polímeros complexos (lignina, queratina, etc) e alto rendimento no processo de produção (DEMAIN, 2007; SILVA; ANGELO; CABRAL, 2013).

Com uso de micro-organismos, pesquisas realizadas no desenvolvimento de processos fermentativos para produção e purificação de enzimas meso e termofílicas, e estudos de suas propriedades bioquímicas, fornecem maiores informações sobre termoestabilidade, conduzindo a uma maior compreensão a respeito de modelagem molecular (LI; ZHOU; LU, 2005).

No estudo de peptidases, o detalhamento da especificidade dos subsítios catalíticos da enzima em interação com diferentes substratos, permite considerar a preferência na hidrólise proteolítica e seus potenciais para aplicações (SILVA et al., 2014).

Neste contexto, investimentos científicos realizados no intuito de explorar o potencial bioquímico microbiano na produção de enzimas, especialmente peptidases fúngicas, são amplamente requeridos e ofertam importantes informações à comunidade científica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micro-organismo e potencial de aplicação

Desde os tempos antigos, micro-organismos são utilizados para obtenção de produtos de interesse humano, como bebidas e alimentos fermentados (pães, cerveja, vinho, etc) (PAPAGIANNI, 2004). Com o avanço tecnológico, o desenvolvimento e aprimoramento de processos fermentativos (bioprocessos submerso e sólido) expandiu o interesse científico e industrial em micro-organismos.

A exploração dos bioprocessos microbianos possibilitou a produção direcionada de enzimas em larga escala, garantindo a utilização destas biomoléculas como produto comercial em diversos setores industriais (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Atualmente, incessantes esforços são realizados na busca por novas enzimas, com destaque para peptidases fúngicas. Em função de sua diversidade bioquímica e habilidade de secreção celular, os fungos são considerados interessantes fontes produtoras destas enzimas (PAPAGIANNI, 2004; SANDHYA et al., 2005; DEMAINE, 2007).

Em relação aos processos microbianos, destaca-se a produção de enzimas por bioprocessos submersos, cuja variação na composição do meio de cultivo, pH do meio e, fontes de carbono e nitrogênio interferem diretamente no rendimento e diversidade na expressão de peptidases (SANDHYA et al., 2005).

Neste bioprocesso, destacam-se vantagens como facilidade de controle de variáveis físico-químicas (pH, temperatura e oxigenação do meio) e melhor distribuição dos componentes do meio (SINHA; SINHA, 2009).

2.2 Enzimas fungicas meso e termofílicas

Enzimas são biocatalisadores de um vasto repertório de reações bioquímicas essenciais para a vida e crescimento dos organismos. Capazes de catalisar reações químicas complexas, com alta estereo e regio-seletividade, essas biomoléculas constituem uma interessante ferramenta comercialmente explorada pelo homem (HOLLIDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009; KUMAR; TAKAGI, 1999).

A necessidade de reações químicas orgânicas em processos industriais que empregam temperaturas elevadas aguça o interesse por novas enzimas com maior funcionalidade e estabilidade térmica. Neste contexto, micro-organismos termofílicos são alvos de estudos para produção destes biocatalisadores (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Enzimas termofílicas apresentam grande interesse industrial e biotecnológico, devido ao fato de resistirem aos processos industriais em altas temperaturas, os quais proporcionam o aumento da solubilidade de muitos substratos poliméricos, decréscimo da viscosidade, aumento da velocidade de reação e a diminuição em riscos de contaminação por micro-organismos (LI et al., 2013; GOMES et al., 2007).

A diversidade genética dos fungos permite que estes organismos colonizem diversos habitats do planeta, sendo cruciais na manutenção de ecossistemas e capazes de produzir e secretar grande variedade de enzimas. (GOMES et al., 2007).

Mediante a esta diversidade, é assumida que a organização molecular é diferente entre organismos mesofílicos e termofílicos, sendo necessário a estes

últimos a adaptação de seu conjunto molecular e metabólico às condições consideradas extremas de temperatura. (HAKI; RAKSHIT, 2003; GOMES et al., 2007).

A comparação entre enzimas meso e termofílicas indica alguns fatores que modulam modificações estruturais em proteínas. Algumas características como maior presença de ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto, interação hidrofóbica e iônica, entre outras, são apontados como possível explicação para termoestabilidade e termoatividade enzimática (LI; ZHOU; LU, 2005).

O maior entendimento e detalhamento sobre estes fatores estruturais e funcionais contribuirão intensamente para a ciência, sendo importante ferramenta para engenharia de proteínas na compreensão sobre o mecanismo de modelagem protéica (ROCA et al., 2007).


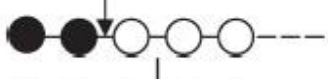

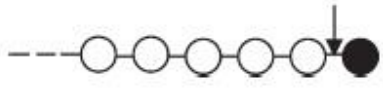

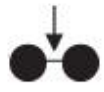
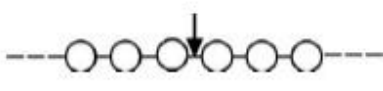
2.3 Peptidases

Peptidases ou proteases são enzimas que catalisam o rompimento de ligações peptídicas em proteína e peptídeo. Compreendem o principal grupo de biocatalisador comercializado industrialmente, sendo produzidos por muitos organismos, tais como plantas, animais, fungos, bactérias e também por vírus (RAO et al., 1998).

Podem ser agrupadas conforme, (1) a fonte de obtenção: animal, vegetal e microbiana; (2) detalhes da reação catalisada: posição do ponto de clivagem, comprimento da cadeia do substrato; (3) mecanismo de ação: resíduo principal do sítio ativo e (4) estrutura molecular. A figura 1 mostra, de forma geral, alguns agrupamentos de peptidases conforme o posicionamento do ponto de clivagem ao longo da cadeia peptídica do substrato (exopeptidases e endopeptidases) e a

natureza do seu sítio catalítico: aspártico, cisteíno, serino, metalo, glutâmico e treonino peptidases (PALMA et al., 2002).

Figura 1. Mecanismo de ação de peptidases.

| Peptidases | Mecanismo de ação |
|---------------------------------------|--|
| Exopeptidases | |
| E.C. 3.4.11 Aminopeptidase |  |
| E.C. 3.4.14 Dipeptidil peptidase |  |
| E.C. 3.4.14 Tripeptidil peptidase |  |
| E.C. 3.4.16 Serino carboxipeptidase |  |
| E.C. 3.4.17 Metalo carboxipeptidase | |
| E.C. 3.4.18 Cisteíno carboxipeptidase | |
| E.C. 3.4.15 Peptidil dipeptidase |  |
| E.C. 3.4.13 Dipeptidase |  |
| Endopeptidases | |
| E.C. 3.4.21 Serino peptidase |  |
| E.C. 3.4.22 Cisteíno peptidase | |
| E.C. 3.4.23 Aspártico peptidase | |
| E.C. 3.4.23.19 Glutâmico peptidase | |
| E.C. 3.4.24 metalo peptidase | |
| E.C. 3.4.25 Treonino peptidase | |

Fonte: RAO et al., 1998; WARD; RAO; KULKARNI, 2009. Figura modificada.

Estas enzimas constituem a subclasse mais abrangente de hidrolases, cujo amplo campo de aplicação reforça os intensos estudos relativos à produção e purificação de novas peptidases. Neste contexto, o estudo de especificidade é um importante parâmetro a ser determinado, pois assim podemos avaliar a preferência dos subsítios da enzima na ancoragem ao substrato (SCHECHTER; BERGER, 1967).

Estas informações são fundamentais para melhorar a compreensão sobre o mecanismo de ação de peptidases, em casos de patógenos o melhor conhecimento sobre o agente de virulência ou sugerir potenciais de aplicações biotecnológicas para estes biocatalisadores.

A utilização destas enzimas é observada em vários seguimentos, especialmente em alimentos, detergentes, couro, biorremediação e pesquisa básica, como em biologia molecular (proteínase K) e técnicas de proteômica (tripsina) (LI et al., 2013; RODRIGUEZ et al., 2008).

2.3.1 Peptidases aspárticas

Peptidases aspárticas são endopeptidases ácidas (E.C. 3.4.23), cujo sítio ativo apresenta dois resíduos de ácido aspártico essenciais para o seu desempenho catalítico. Em geral apresentam ótima atividade na faixa de pH 3-6, ponto isoelétrico de 3-4,5 e usual inibição por pepstatina A, um hexapeptídeo produzido por *Streptomyces*, e também na presença de íons cobre II (YEGIN et al., 2011).

Este grupo de peptidases é empregado em diversos setores industriais, tais como, fabricação de queijo, hidrolisados de caseína, síntese de peptídeos, e degradação de turbidez no complexo de proteínas a partir de suco de frutas (YEGIN et al., 2011).

Na produção de queijo, peptidases aspárticas microbianas podem ser utilizadas como substituto da quimosina obtida de ruminantes recém-nascidos. Esta enzima (quimosina) é importante na coagulação do leite durante o processo de produção de queijo, cuja hidrólise da *k*-caseína ocorre entre a ligação peptídica dos resíduos de aminoácidos Phe₁₀₅-Met₁₀₆, sendo esta etapa, crucial para a coagulação do leite (KUMAR et al, 2010). No entanto, a extração de quimosina de ruminantes

esbarra em problemas éticos e, desta forma, a enzima de origem microbiana seria uma atrativa alternativa com baixo custo e menor tempo de produção (KUMAR et al, 2010; HSIAO et al, 2014).

Endothia parasitica e espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Rhizomucor* são fungos produtores de peptidases aspárticas. *Rhizomucor miehei* é fungo termofílico com reconhecida capacidade de produção de peptidases ácidas e aplicadas industrialmente (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; YEGIN et al., 2011).

2.3.2 Cisteíno peptidases

Cisteíno ou tiol peptidases são endopeptidases (E.C. 3.4.22), cuja ação catalítica é dependente de um resíduo de cisteína no sítio ativo. A díade catalítica é geralmente constituída por His e Cys. Apresentam pH ótimo na faixa de 4,5-7 e massa molecular entre 20-35 kDa. Devido à alta tendência de oxidação do grupo tiol, geralmente se faz necessário a presença de agente redutor em meio reacional para catálise desta enzima. Cisteíno peptidase exhibe inibição por ácido iodo acético, N-Etilmaleimida, E-64, entre outros inibidores (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; GRZONKA et al., 2001).

Cisteíno peptidases estão presentes em todos os organismos. Muitas destas peptidases são encontradas em vírus, bactérias, fungos, protistas (*Trypanossoma cruzi* – cruzipáina) e plantas (papaína). Mamíferos apresentam dois principais grupos de cisteíno peptidases, calpaínas (tipo I e II) e catepsinas lisossomais. Entretanto, relatos de cisteíno peptidase extracelular de origem fúngica são pouco descritos na literatura e, portanto, mais estudos são importantes para agregar maiores informações relativas a propriedades bioquímicas desta subclasse de

peptidases extracelular fúngicas (WARD; RAO; KULKARNI, 2009; GRZONKA et al., 2001).

2.3.3 Serino peptidases

Serino peptidases (E.C. 3.4.21) compreende o grupo mais abundante de endopeptidases. Estas peptidases são caracterizadas por apresentar dependência de um resíduo de serina como responsáveis pelo seu desempenho catalítico, tendo a tríade catalítica constituída por His, Ser e Asp. Além de endopeptidases, também há representantes de exopeptidases, apresentam pH ótimo na faixa de 6-11 e ponto isoelétrico com valores na faixa de 4-6. Algumas serino peptidases alcalinas de origem fúngicas, produzidas por espécies de *Aspergillus*, *Conidiobolu* e *Neurospora*, apresentam pH ótimo em torno de 10 e elevados ponto isoelétrico (8-9) (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; WARD; RAO; KULKARNI, 2009).

Serino peptidases alcalinas são muito requeridas na utilização no tratamento de couro, melhoramento no sabor de queijo, tratamento de massa em panificação, hidrólise de ração animal para melhoramento da digestibilidade e, indústria de detergentes (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

Serino peptidases exibem inibição por PMSF, inibidor de tripsinas, antipaína, quimostatina entre outros (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006).

2.3.4 Metallo peptidases

Metallo peptidases (E.C. 3.4.24) são endo e exo peptidases dependentes de íon divalente, geralmente zinco, para desempenho de sua catálise. O sítio ativo é constituído basicamente por His-Glu-Xaa-Xaa-His, onde "Xaa" representa aminoácidos iguais (repetição de um mesmo aminoácido). O resíduo de histidina

está envolvido na acomodação do íon zinco e o resíduo de ácido glutâmico diretamente envolvido na função catalítica (WARD; RAO; KULKARNI, 2009; RAO et al., 1998).

Estas enzimas constituem um grupo variado de peptidases, tais como, collagenases e elastases microbianas (bactérias e fungos), toxinas hemorrágicas de venenos de serpentes, termolisina de bactérias, (RAO et al., 1998).

Metalo peptidases apresentam inibição por agentes quelantes como EDTA e EGTA, cuja remoção de íon divalente interfere diretamente na sua catálise (TYNDALL; NALL; FAIRLIE, 2005).

2.3.5 Treonino peptidases

Descoberto em 1995, trata-se do quinto grupo de peptidase (E.C. 3.4.25) com distinto modo de ação, cuja catálise é dependente de um resíduo de treonina presente no sítio ativo. Encontrada em complexo de subunidades no proteossoma de *Saccharomyces cerevisiae* e, responsável pela hidrólise de ampla gama de proteínas em meio intracelular, notou-se dificuldade na inibição da proteólise por meio de inibidores convencionais de peptidases e ainda constitui um grupo de enzima pouco conhecido e com raras informações disponíveis.

Também tem sido encontrada em proteossoma de bactérias e arqueobactérias (WARD; RAO; KULKARNI, 2009).

2.3.6 Glutâmico peptidases

Identificada como carboxil peptidase insensível a pepstatina A, este constitui o sexto e mais recente grupo de peptidase encontrada primariamente em *Scytalidium lignicolum* e inicialmente agrupada como uma peptidase aspártica, cuja ação

proteolítica não sofria efeito de inibição por pepstatina A. Desde meados de 1970 têm sido reportadas em espécies bacterianas e fúngicas, peptidases ácidas insensíveis a pepstatina A. Posteriormente, algumas peptidases ácidas bacterianas tiveram suas estruturas tridimensionais resolvidas, em cujos resultados demonstraram similaridade com estrutura de subtilisina e apresentando tríade catalítica composta por serina, ácido glutâmico e ácido aspártico, sendo assim, classificada na família de serino peptidases (KATAOKA et al., 2005; PILLAI et al., 2007).

Conforme estudos posteriores de cristalografia em peptidase ácida de *Scytalidium lignicolum* (Scytalidoglutâmico peptidase) e *Aspergillus niger* var. *microsporus* (Aspergiloglutâmico peptidase), revelou-se a presença de uma díade catalítica formada por ácido glutâmico e glutamina e, uma estrutura tridimensional diferentes das demais peptidases até então conhecidas. Atualmente estas enzimas são nomeadas como um diferenciado subgrupo de peptidases, glutâmico peptidases (E.C. 3.4.23.19) (WARD; RAO; KULKARNI, 2009).

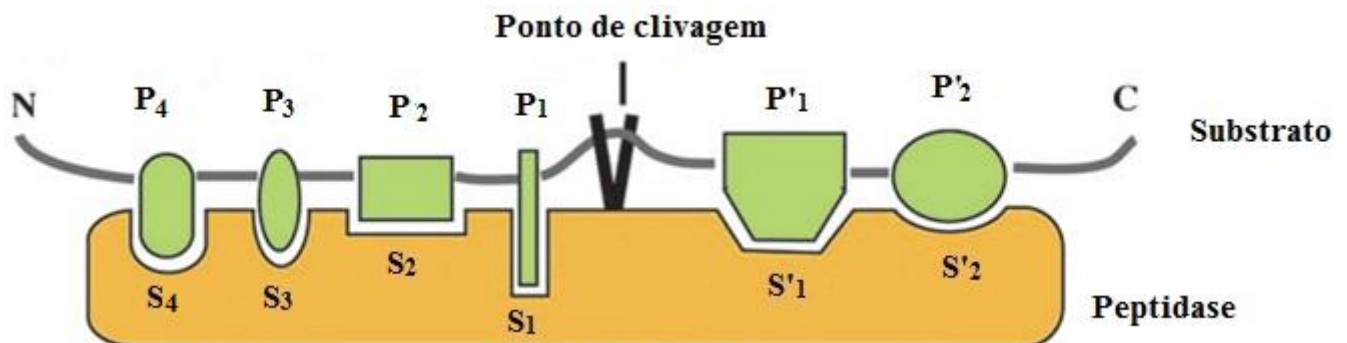
A respeito de suas características bioquímicas, glutâmico peptidases encontradas em *Aspergillus niger* var. *microsporus* apresentaram ótima atividade em pH 2 e 1,1, usando caseína e hemoglobina como substrato, respectivamente. Até então, peptidases com estrutura molecular similar a Scytalido e Aspergilo glutâmico peptidases, foram descritas apenas em fungos, tais como, *Aspergillus niger*, *Cryphonectria parasitica*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Botrytis cinerea* e *Talaromyces emersonii* (YABUKI et al., 2004; PILLAI et al., 2007).

2.4 Especificidade das peptidases

A habilidade das peptidases em discernir entre dois ou mais substratos que competem entre si ocorre em função das características físico-químicas dos subsítios da enzima e também dos substratos que interagem com a mesma (SCHECHTER; BERGER, 1967).

Schechter e Berger (1967) elaboraram a nomenclatura do sítio catalítico das peptidases, dividindo-o em séries de subsítios, sendo que cada subsítio acomoda um único e consecutivo resíduo de aminoácido do substrato (**Figura 2**).

Figura 2. Modelo de sítio ativo de uma peptidase. A figura mostra um sítio ativo com seis subsítios. A partir do ponto de clivagem, subsítios flanqueiam o lado N-terminal (S_4 , S_3 , S_2 e S_1) e C-terminal (S'_1 e S'_2).



Fonte: FARADY; CRAIK, 2010. Figura modificada.

Os resíduos de aminoácidos dos substratos são numerados a partir do ponto de clivagem da ligação peptídica. A porção $P_n \dots P_3 P_2 P_1$ está na direção aminoterminal, já a porção $P'_1 P'_2 P'_3 \dots P'_n$ está na direção carboxiterminal do substrato, enquanto os subsítios correspondentes na peptidase são $S_n \dots S_3 S_2 S_1 S'_1 S'_2 S'_3 \dots S'_n$.

Substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência compreendem a classe mais versátil de substratos sintéticos para peptidases disponíveis atualmente. Esta classe de substrato é útil para ampla aplicação na

enzimologia, devido sua simplicidade, rapidez e precisão na determinação das constantes reacionais (ALVES et al., 2007).

2.5 Aplicações de peptidases

Com ampla aplicação em diversos setores, ressalta-se o maior uso de peptidases na área de alimentos (laticínios) e em produtos de limpeza (detergentes), sendo também direcionada a produtos de manufatura como couro e tratamento de resíduos orgânicos queratinosos (penas) (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Peptidases microbianas constituem o principal grupo de enzimas utilizadas industrialmente, responsável por cerca de 2/3 do total de enzimas comercializadas. Na indústria farmacêutica, ressaltam-se exemplos de aplicação de peptidases, como collagenases empregadas em práticas médicas para remoção de manchas e queloides, e no tratamento de queimaduras e úlceras (SUKHOSYROVA et al., 2003). A ação de peptidases sobre colágeno, queratina e elastina, permite a estas enzimas serem utilizadas como componentes essenciais em cremes esfoliantes e pomadas (GUPTA et al., 2002).

Na indústria de alimentos, peptidases podem ser empregadas na coagulação do leite através da hidrólise da ligação peptídica específica em *k*-caseína (Phe₁₀₅-Met₁₀₆) para produção de queijos. Neste uso, destaca-se a ação da quimosina (aspártico peptidase) sendo a peptidase preferida neste processo devido a alta especificidade pela *k*-caseína (RAO et al., 1998).

Segundo Sinha et al., (2007), as proteínas do soro de leite resultantes do processo de produção de queijo, apresentam alto valor nutritivo e têm ganhando aceitação na utilização como suplemento alimentar, sendo ricas em aminoácidos essenciais e aminoácidos sulfonados (cisteína) de importante função antioxidante.

A hidrólise dessas proteínas é realizada por peptidases ácidas e alcalinas, que disponibilizam peptídeos livres biologicamente ativos com potencial de utilização como importante fonte de aminoácidos em casos de intolerância infantil a proteínas do leite.

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

Nos hidrolisados protéicos, as peptidases também vem sendo utilizadas para o melhoramento do sabor. Esses hidrolisados de proteína, em geral, podem apresentar sabor amargo decorrente da liberação de peptídeos contendo aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades e/ou resíduo de prolina no centro da molécula. Para remoção do gosto amargo, algumas endo e exopeptidases têm sido amplamente estudadas como valiosas ferramentas de clivagem específica de aminoácidos hidrofóbicos e prolina (FITZGERALD; O'CUINN, 2006).

Na panificação, enzimas proteolíticas também podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas, como por exemplo, peptidases produzidas por *Aspergillus oryzae*, cuja ação sobre a proteína do glúten da farinha de trigo afeta a elasticidade e a textura, além de contribuir para redução do tempo de mistura da massa e no custo de produção (RAO et al., 1998).

O uso de peptidases como aditivos na composição de detergentes responde pelo maior emprego comercial destas enzimas e, sua aplicação se deve a atividade e estabilidade em pH alcalino e a formulação dos detergentes, além de sua ação em uma ampla variedade de substratos protéicos em combinação com amilases, celulasas e lipases (RAO et al., 1998).

Em curtumes o uso de peptidases ocorre como forma alternativa de tratamento do couro, em substituição a aditivos químicos perigosos, como sulfeto de sódio que apresenta risco de contaminação do solo e efluentes. O uso de enzimas proteolíticas assegura a redução da poluição ambiental e também melhora na qualidade do couro, sendo sua utilização baseada na hidrólise seletiva de proteínas não colágenas e não fibrosas como, albumina e globulina (RAO et al., 1998).

Agregando valor a matéria orgânica residual, peptidases queratinolíticas poderiam ser utilizadas para degradação de proteínas fibrosas animais (queratina) em penas, chifres, cabelos e unhas disponíveis como resíduos naturais. Essa ação enzimática disponibilizaria biomassa útil podendo ser utilizados em suplementação a nutrição animal entre outras aplicações (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997).

Neste contexto a exploração do potencial bioquímico microbiano na produção destas enzimas, purificação e o estudo de especificidade catalítica de diferentes grupos de peptidases constituem uma importante proposta a pesquisa e ao desenvolvimento biotecnológico.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste projeto foi avaliar comparativamente as propriedades bioquímicas funcionais das peptidases secretadas por fungos mesofílicos *Phanerochaete chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp. e termofílico *Rhizomucor miehei*.

Os objetivos específicos deste projeto compreenderam:

1. Produção das peptidases (bioprocesso submerso),
2. Purificação das peptidases secretadas pelos fungos mesofílicos e termofílico;
3. Determinação das propriedades bioquímicas (efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases, efeito de íons, inibidores, surfactantes etc).
4. Determinação da especificidade das peptidases, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência, com variações nas posições P₃, P₂, P₁, P'₁, P'₂ e P'₃.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos e meio de manutenção

O fungo termofílico, *Rhizomucor miehei*, e os mesofílicos, *Leptosphaeria* sp. e *Phanerochaete chrysosporium* foram isolados a partir de matéria orgânica em decomposição no solo, cultivados e mantidos em ágar de batata-dextrose a 30 °C (mesofílicos) e a 45 °C (termofílico) durante 168 horas.

A manutenção dos isolados fúngicos foi realizada com repiques periódicos (a cada 15 dias) em meio ágar de batata-dextrose. Após repique dos fungos em tubos de ensaio, a preservação das culturas foi realizada com uso de óleo mineral e água estéril (método de Castellani) recobrando o micélio no meio de cultivo.

4.2 Bioprocesso submerso (BSm)

A produção de peptidase foi realizada por BSm em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL do seguinte meio de cultivo: KH_2PO_4 (0,7%), K_2HPO_4 (0,2%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01%), citrato $2\text{H}_2\text{O}$ (0,05%), extrato de levedura (0,1%) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,01%) (SILVA et al., 2013). Para o fungo *R. miehei* o meio foi suplementado com caseína (0,5%) e o pH do meio foi ajustado para 5. Em BSm dos fungos *Leptosphaeria* sp. e *P. chrysosporium* foram adicionados 2% de farinha de pena (pena de frango triturada) e o pH do meio foi ajustado para 6. Os frascos foram autoclavados por 15 min a 121 °C e o inóculo foi realizado com 1 ml de suspensão micelial, conforme o crescimento normalizado mencionado no ítem 4.1.

O tempo de fermentação foi de 24 horas para BSm de *R. miehei* e 96 horas para os fungos mesofílicos *Leptosphaeria* sp. e *P. chrysosporium*. Na extração, o material fermentado foi filtrado em papel Whatman n.º 1, centrifugado a 8.000xg

durante 20 min a 4 °C e o sobrenadante foi utilizado para quantificar a atividade proteolítica e posterior etapas de purificação.

4.3 Quantificação de proteína total

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

4.4 Determinação da atividade proteolítica e concentração do extrato bruto

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico, com algumas modificações (SARATH; DE LA MOTTE; WAGNER, 1996). A mistura reacional foi composta por 0,2 mL de enzima e 1 mL de solução caseína 1% (m/v) dissolvida em tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M, pH 6,5. A reação foi realizada a 45 °C e interrompida com a adição de 0,6 mL de ácido tricloroacético 10% (TCA) após 120 min. Os tubos reações foram centrifugados a 10.000xg durante 15 minutos a 25 °C, e a absorbância do sobrenadante foi mensurada a 280 nm em espectrofotômetro. Para cada tubo de reação foi preparado um tubo controle apropriado, em que o TCA foi adicionado anteriormente a solução enzimática. A Unidade de atividade enzimática (U.A.) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µM tirosina/min sob as condições de ensaio (MEYERS; AHEARN, 1977).

O volume total de extrato enzimático bruto foi concentrado e parcialmente purificado, utilizando sistema de concentração *Flex Stand System* (GE Healthcare), cuja filtração do extrato fermentado foi realizada utilizando um cartucho de membrana de 10 kDa. Durante o processo de concentração, a amostra foi constantemente mantida pré-refrigerada a 4 °C.

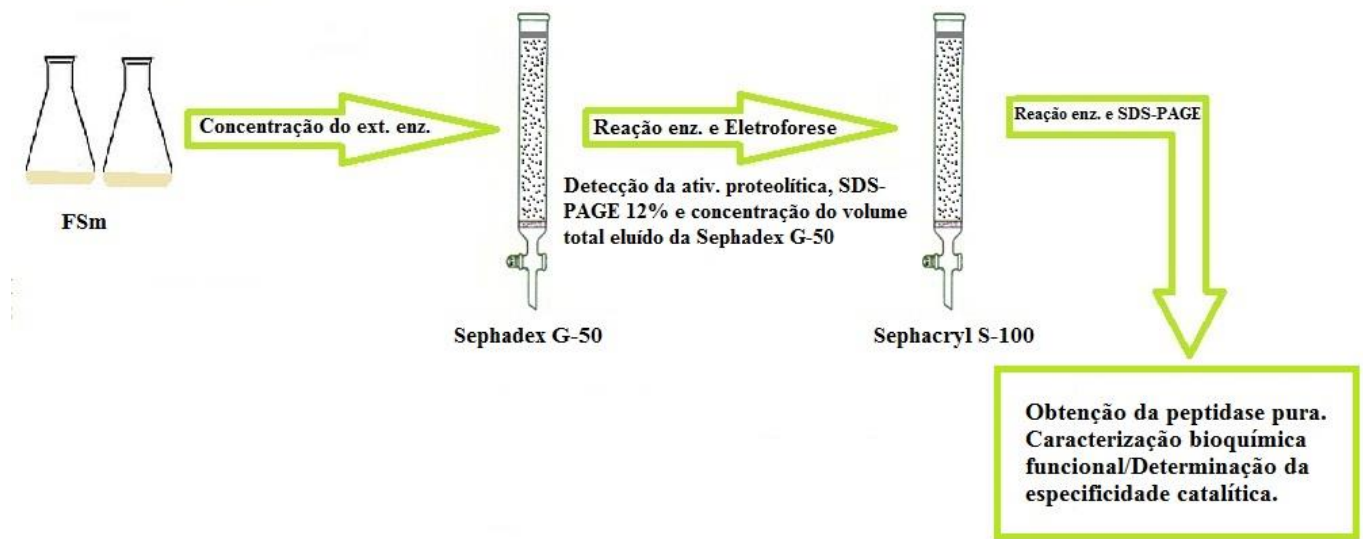
4.5 Etapas cromatográficas

O comportamento das proteínas no processo de purificação não é previsível, de modo que, cada enzima requer um protocolo específico. Em nosso estudo, realizamos os ensaios cromatográficos dos extratos brutos provenientes de BSm dos fungos *R. miehei*, *P. chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp., utilizando processos cromatográficos clássicos de exclusão molecular e troca iônica

4.5.1 Peptidase secretada por *R. miehei*

Conforme mostrado na **figura 3**, na purificação do extrato bruto proveniente de BSm com o fungo *R. miehei*, utilizamos cromatografias de exclusão molecular com resinas Sephadex G-50 e Sephacryl S-100, ambas empacotadas em colunas com dimensões de 100 cm x 4 cm (altura x diâmetro). As resinas foram previamente equilibradas com 1,5 vezes o volume total de resina, vazão de 0,6 mL/min e coleta de frações com volume de 5 mL. O extrato bruto, proveniente de BSm e concentrado, foi aplicado primeiramente em resina Sephadex G-50, utilizando tampão acetato de sódio (0,05 M) com adição de NaCl (0,05 M), pH 5. As frações eluídas foram analisadas quanto à atividade proteolítica, de acordo com o descrito no item 4.4 e o perfil de eluição protéica foi avaliado por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Subsequentemente, as frações que apresentaram atividade proteolítica foram analisadas em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Figura 3. Fluxograma da metodologia envolvendo a produção, purificação e caracterização bioquímica funcional da peptidase secretada por *R. miehei*.



Posteriormente, as frações com perfis eletroforéticos similares foram reunidas e concentradas por filtração (Amicon), utilizando um filtro de membrana de 5 kDa (Millipore, EUA). A amostra concentrada foi aplicada em cromatografia contendo a resina Sephacryl S-100, utilizando tampão acetato de sódio (0,05 M) em pH 5, com adição de NaCl (0,15 M). A atividade proteolítica e o perfil de eluição proteolítica foram mensurados novamente. As frações contendo atividade proteolítica foram analisadas por SDS-PAGE (12%) (LAEMMLI, 1970) e coradas com nitrato de prata de acordo com See e Jackowski (1989). A massa molecular da peptidase foi estimada por análise em software *Image Lab 3.0* (BIO-RAD).

4.5.2 Purificação das peptidases secretadas pelos fungos *P. chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp.

O processo de purificação das peptidases oriundas do bioprocessamento submerso dos fungos *P. chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp. foram realizados utilizando as mesmas etapas e resinas cromatográficas.

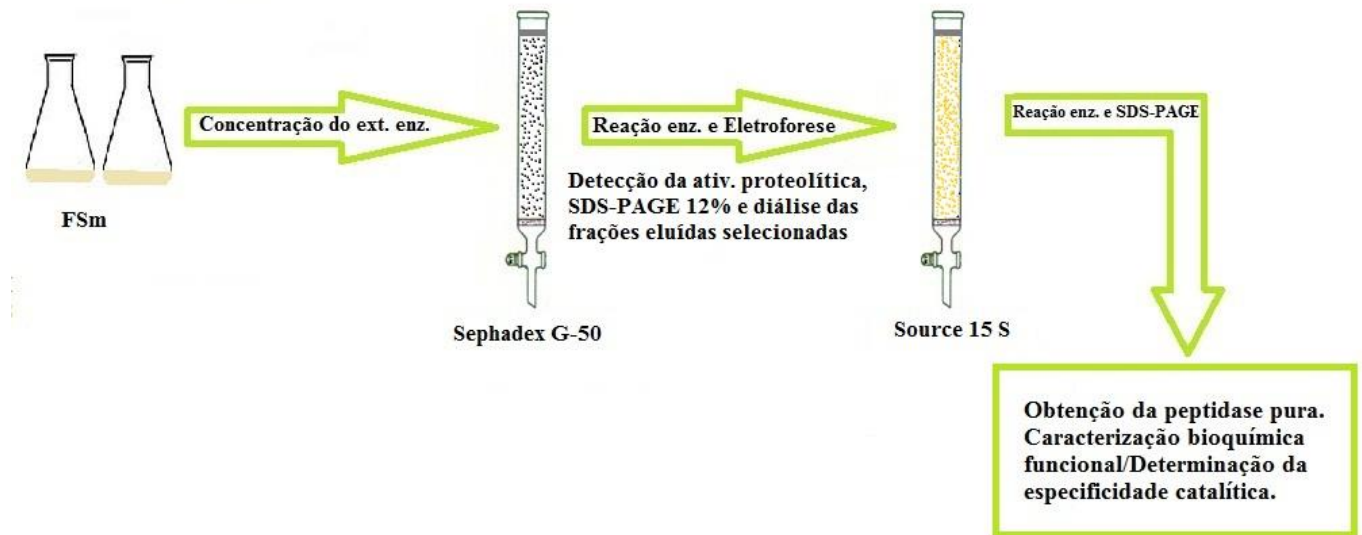
Após a etapa de concentração do extrato bruto, a amostra foi aplicada em resina Sephadex G-50 empacotada em coluna na dimensão de 100 cm x 4 cm (altura x diâmetro). Utilizando tampão acetato de sódio, (0,05 M) com adição de NaCl (0,05 M), pH 5; a resina foi previamente equilibrada com um volume correspondente a 1,5 vezes o total de resina, vazão de 0,6 mL/min e volume de coleta de 5 mL por tubo.

As frações eluídas foram mensuradas por ensaio proteolítico, conforme é descrito no item 4.4, e o perfil de eluição protéica foi avaliado por leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Depois disso, as frações com atividade proteolítica foram analisadas por gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970).

Frações com perfis eletroforéticos semelhantes foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio (0,05 M), pH 4,5. Em seguida, a amostra foi aplicada em cromatografia de troca iônica catiônica, utilizando resina Source 15S empacotada em coluna (10 cm x 1 cm). A coluna foi acoplada em *HPLC Äkta purifier* (GE Healthcare) e previamente equilibrada com um volume equivalente a dez volumes de resina. A vazão foi mantida em 1 mL/min utilizando tampão acetato de sódio (0,05 M), pH 4,5 (tampão A) e o mesmo tampão contendo 0,2 M de NaCl (tampão B). Frações foram coletadas com volume de 1,5 mL.

A atividade enzimática foi novamente mensurada e, as frações eluídas com atividade proteolítica foram avaliadas por SDS-PAGE (12%) (LAEMMLI, 1970) e coradas com nitrato de prata de acordo com See e Jackowski (1989) (**Figura 4**). As massas moleculares das peptidases foram estimadas por análise em software *Image Lab 3.0* (BIO-RAD).

Figura 4. Fluxograma da metodologia envolvendo a produção, purificação e caracterização bioquímica funcional das peptidases secretadas por *P. chrysosporium* e *Leptosphaeria* sp.



4.6 Caracterização bioquímica funcional das peptidases

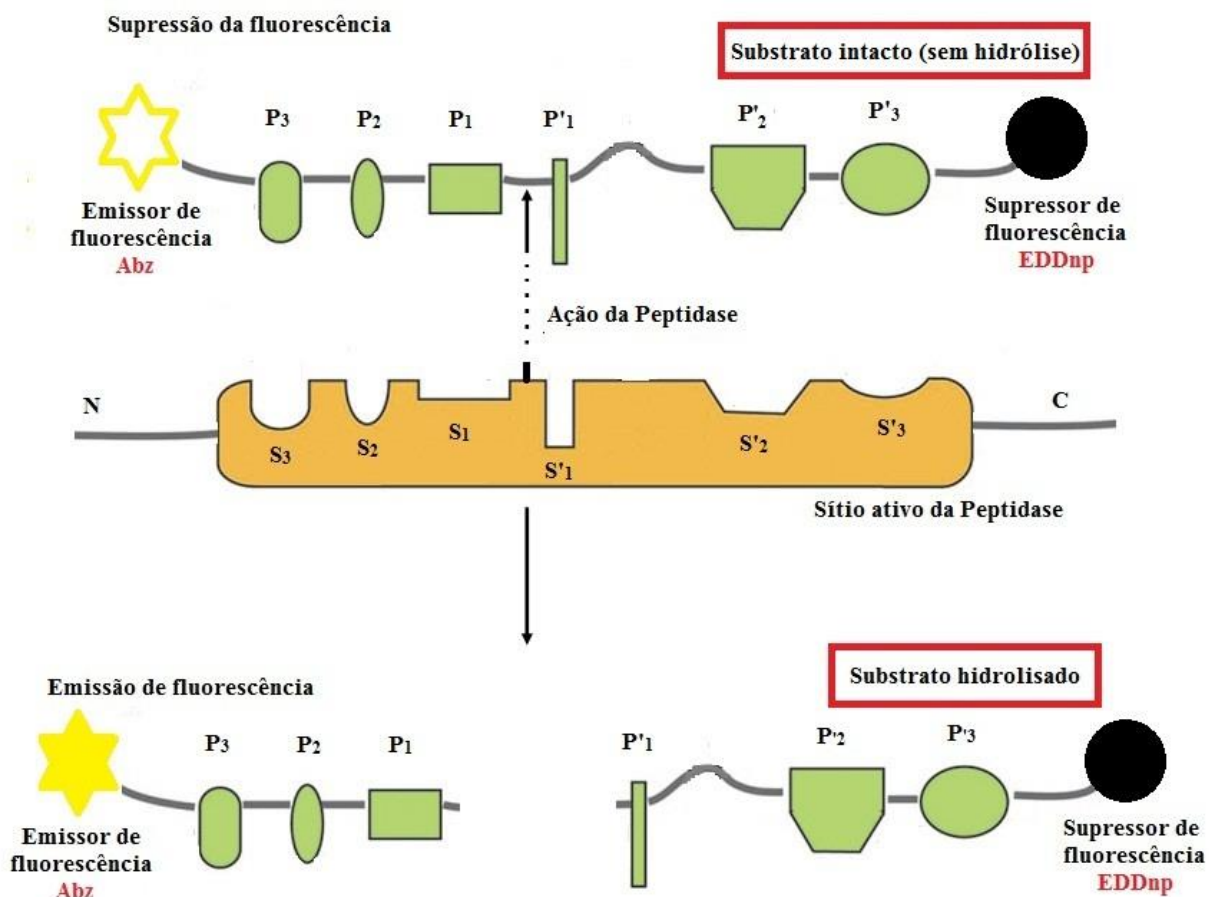
Os estudos de caracterização bioquímica funcional foram realizados utilizando o substrato sintético de supressão intramolecular de fluorescência **Abz-KLRSSKQ-EDDnp**, na concentração final de 1 μM e as enzimas tituladas pelo sítio ativo com concentrações estimadas em 5 μM (peptidase aspártica), 3 μM (cisteíno peptidase) e 0,1 mM (serino peptidase).

A hidrólise proteolítica foi monitorada de acordo com a fluorescência emitida do substrato FRET em espectrofluorímetro Lumina fluorescência (Thermo Scientific) nos comprimentos de ondas de excitação = 320 nm e emissão = 420 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

Os substratos utilizados em nosso trabalho, apresentam um grupo supressor (EDDnp) e emissor (Abz) de fluorescência posicionado no lado C-terminal e N-terminal do substrato, respectivamente. Em condições intactas (sem hidrólise), o substrato apresenta baixa fluorescência em decorrência da supressão promovida pelo grupo supressor sobre o emissor. Contudo, sob efeito de catálise enzimática

(peptidase), o conseqüente distanciamento entre os grupos EDDnp e Abz, possibilita o aumento da fluorescência, como resposta ao efeito da hidrólise do substrato (Figura 5).

Figura 5. Modelo esquemático de substrato com supressão intramolecular de fluorescência durante a catálise enzimática. Demonstração de hidrólise de substrato peptídico e simulação da acomodação dos subsítios catalíticos nas posições correspondentes na cadeia peptídica do substrato. Comprimentos de ondas de excitação = 320 nm e emissão = 420 nm.



Fonte: FARADY; CRAIK, 2010; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011. Figura modificada.

4.6.1 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases

Estes estudos foram realizados utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp. A determinação do pH ótimo para a atividade da peptidase foi realizada a 45 °C (para as 3 peptidases) utilizando os seguintes tampões: acetato (pH 4,5 e 5,0), MES

(pH 5,5; 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0; 7,5 e 8,0), Bicine (pH 8,5 e 9,0) e CAPS (pH 9,5; 10,0 e 10,5), todos a 0,1 M. A estabilidade por efeito de pH foi estudada por incubação da peptidase durante 1 h a 25 °C nos diferentes pH (pH 4,5 a 10,5).

O efeito da temperatura na atividade das peptidases foi investigado na faixa de 35 °C a 70 °C e, a estabilidade térmica, nos tempos de incubação de 5, 30 e 60 min, na faixa de temperatura de 40 °C a 55 °C, com incrementos de 5 °C.

4.6.2 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade das peptidases

Para determinar o mecanismo de ação das peptidases seguiu-se o protocolo descrito por Dunn (1989), com modificações. Foram utilizados os seguintes inibidores: ácido iodoacético (AIA), N-Etilmaleimida (NEM), fluoreto de fenil metil sulfonila (PMSF), ácido etileno-diaminotetraacético (EDTA) na concentração final de 5 mM e pepstatina A a 0,2 mM.

Nós também avaliamos a atividade das peptidases em presença dos seguintes sais na concentração final de 5 mM: cloretos de: alumínio (AlCl_3), bário (BaCl_2), cálcio (CaCl_2), cobalto (CoCl_2), cobre II (CuCl_2), lítio (LiCl) magnésio (MgCl_2), manganês (MnCl_2), potássio (KCl) e sódio (NaCl).

Em todos os ensaios as enzimas foram pré-incubadas por 5 min a temperatura de reação. As reações foram realizadas nas condições ótimas de pH e temperatura de cada peptidase.

4.6.3 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade das peptidases

O estudo sobre o efeito dos surfactantes sobre a atividade proteolítica foi realizada em diferentes concentrações (0,02% a 1%), utilizando os seguintes agentes tensoativos, Tween 20, Triton X-100, brometo de cetil-trimetil amônio

(CTAB) e dodecil sulfato de sódio (SDS). No estudo com outros agentes desnaturantes, também foi investigado o efeito da ureia, Ditioneitol (DTT) e guanidina nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 100, 150 e 200 mM.

4.6.4 Determinação da concentração molar e especificidade das peptidases

A concentração da peptidase ativa foi quantificada utilizando a metodologia de titulação do sítio ativo com um correspondente inibidor da atividade da peptidase, conforme metodologia descrita por Klemencic et al. (2000) com modificações. Utilizamos as concentrações de 5 μ M (peptidase aspártica), 3 μ M (cisteíno peptidase) e 0,1 mM (serino peptidase).

Em aspartil, cisteíno e serino peptidase, utilizamos os seguintes inibidores pepstatina A, NEM e PMSF, respectivamente. Para o estudo da especificidade catalítica foi utilizado seis séries de substratos de supressão intramolecular de fluorescência, Abz-~~X~~LRSSKQ-EDDnp, Abz-K~~X~~RSSKQ-EDDnp, Abz-KL~~X~~SSKQ-EDDnp, Abz-KLR~~X~~SKQ-EDDnp, Abz-KLRS~~X~~KQ-EDDnp e Abz-KLRSS~~X~~Q-EDDnp, cuja eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtido pela substituição combinatória de aminoácidos nas diferentes posições **X**, determina a especificidade de cada subsítio catalítico (S_3 , S_2 , S_1 , S'_1 , S'_2 e S'_3) para os aminoácidos avaliados em cada série peptídica. Os ensaios cinéticos foram realizados nas condições ótimas de pH e temperatura de cada peptidase.

Os parâmetros cinéticos de K_M e V_{max} foram obtidos de acordo com a equação de Michaelis-Menten gerada a partir dos dados de hidrólise calculados por regressão não-linear utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

5. RESULTADOS

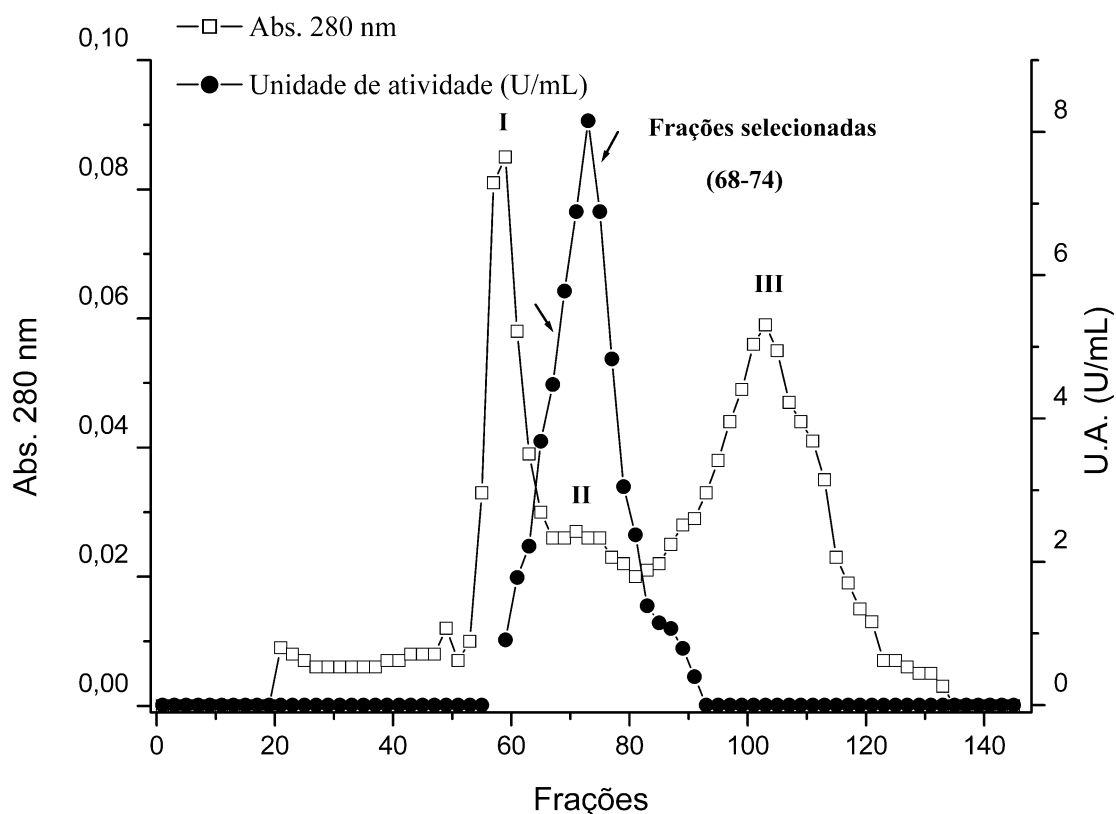
Para fins de melhor compreensão, nós dividimos os resultados de purificação, caracterização bioquímica funcional e estudo de especificidade das peptidases e os expusemos de forma separada para cada fungo.

5.1 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso *R. miehei*

5.1.1 Purificação

Conforme **figura 6**, em cromatografia utilizando resina Sephadex G-50, observamos três picos de eluição proteica (I, II e III) e atividade proteolítica detectada somente no pico II. As frações correspondentes a este pico (frações 68-74), cuja análise eletroforética demonstrou semelhança, foram então, reunidas e concentradas.

Figura 6. Cromatograma do extrato bruto proveniente de BSm com o fungo *R. miehei* aplicado em resina Sephadex G-50 (coluna 100 cm x 4 cm). Tampão acetato de sódio (0,05 M) + NaCl (0,05 M), pH 5. Vazão de eluição correspondente a 0,6 mL/min e volume de coleta de 5 mL.



Na segunda etapa, a amostra foi aplicada em Sephacryl S-100. O cromatograma mostrou quatro picos proteicos em absorção a 280 nm (**Figura 7**), sendo a atividade enzimática detectada nas frações correspondentes ao pico II.

Em análise por SDS-PAGE 12% foi observada a peptidase pura na faixa de frações 75 a 83, e massa molecular estimada em 37 kDa (**Figura 8**).

Figura 7. Cromatograma resina Sephacryl S-100 (coluna 100 cm x 4 cm). Amostra proveniente da cromatografia com resina Sephadex G-50. Tampão acetato de sódio (0,05 M) + NaCl (0,15 M), pH 5. Vazão de eluição correspondente a 0,6 mL/min e volume de coleta de 5 mL.

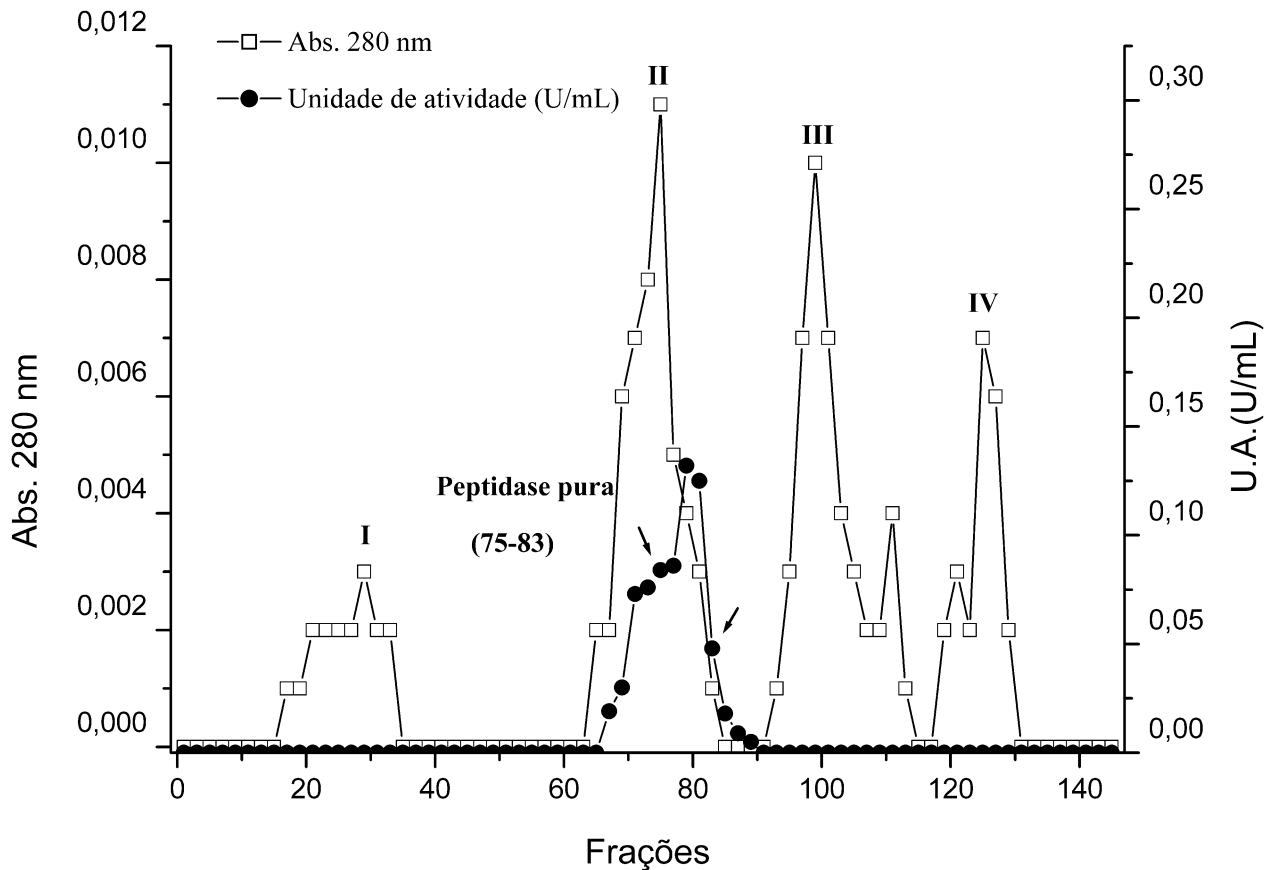
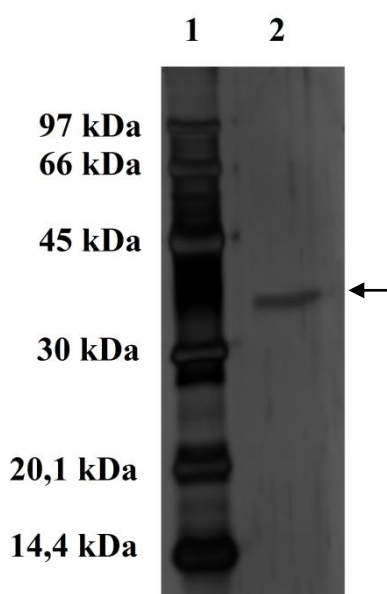


Figura 8. SDS-PAGE 12%. Peptidase secretada pelo fungo *R. miehei*. Marcador de massa molecular (1) e peptidase pura (2). As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



Todas as etapas de purificação realizadas estão relacionadas na **tabela 1**. O rendimento final foi de 2,7% e taxa de purificação de 2,3 vezes.

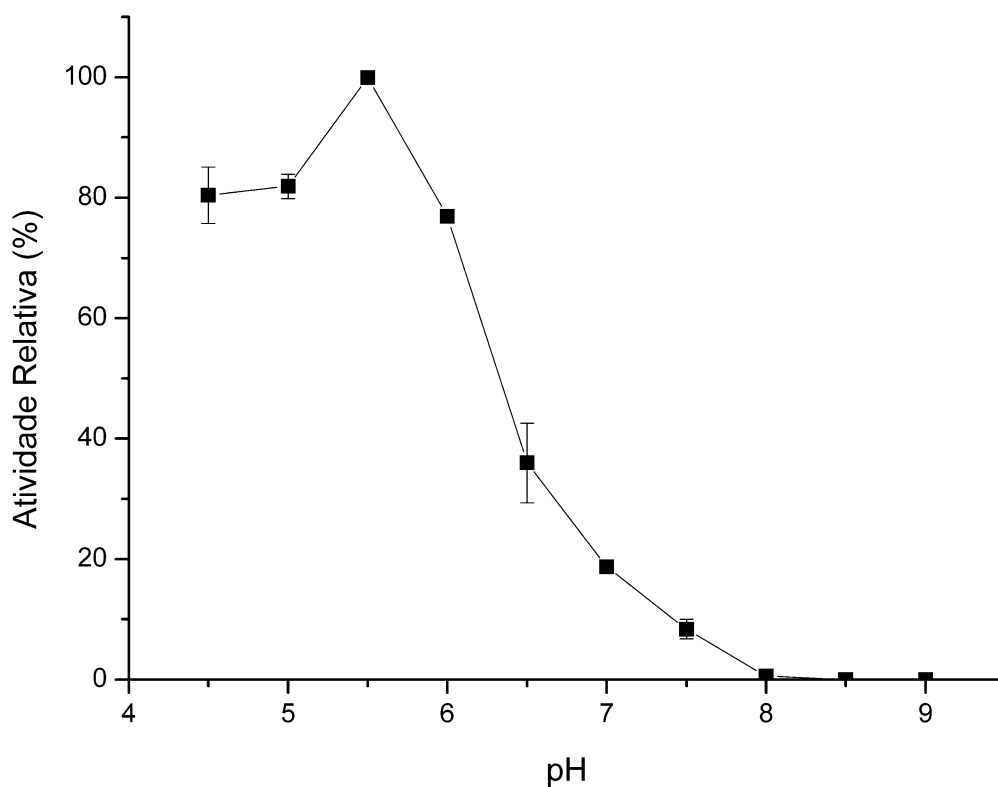
Tabela 1. Sumário de purificação da peptidase secretada por *R. miehei*

| Etapas de purificação | Atividade total (U.A.) | Proteína total (mg) | Atividade específica (U.A./mg) | Purificação | Rendimento (%) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| Extrato bruto (BSm) | 2.340,0 | 6,0 | 390,0 | 1,0 | 100,0 |
| Extrato concentrado | 1.560,0 | 3,9 | 400,0 | 1,0 | 66,5 |
| Sephadex G-50 | 310,0 | 0,6 | 516,5 | 1,3 | 13,0 |
| Sephacryl S-100 | 64,0 | 0,07 | 914,0 | 2,3 | 2,7 |

5.1.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por *R miehei*

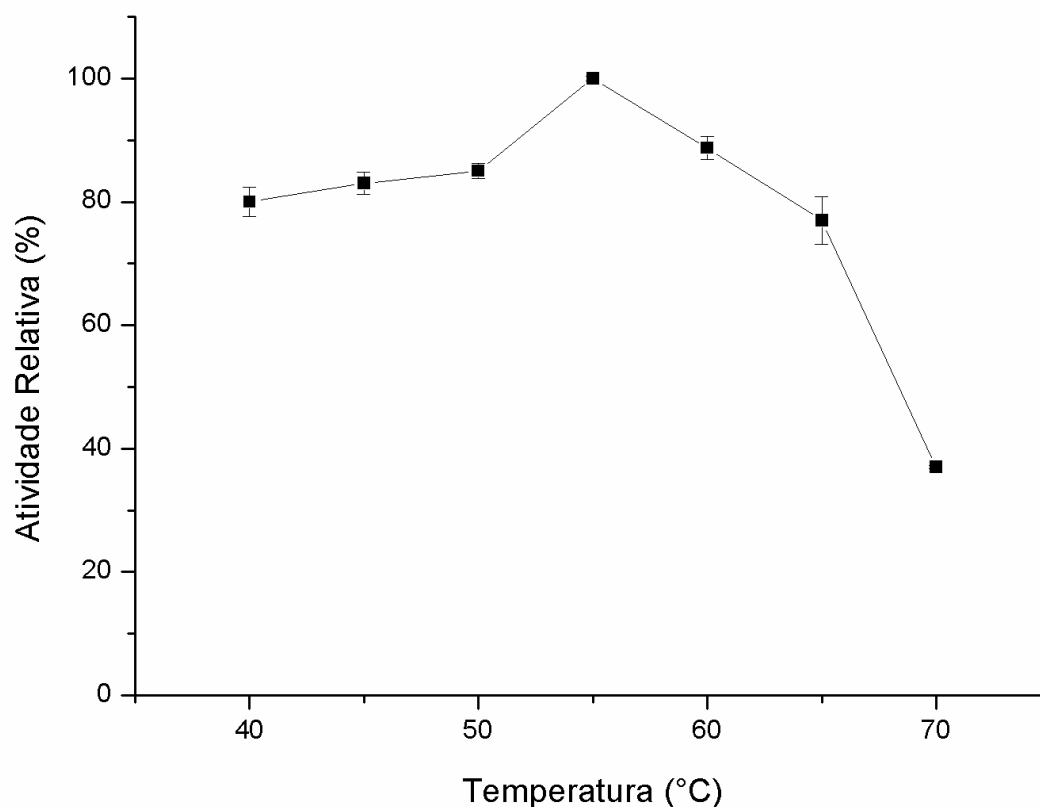
Conforme observamos, a peptidase secretada por *R. miehei* apresentou máximo de atividade a pH e temperatura estimados em 5,5 e 55 °C, respectivamente (Figuras 9 e 10).

Figura 9. Efeito de pH na atividade da peptidase secretada por *R. miehei*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: temperatura de 45 °C; 5 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



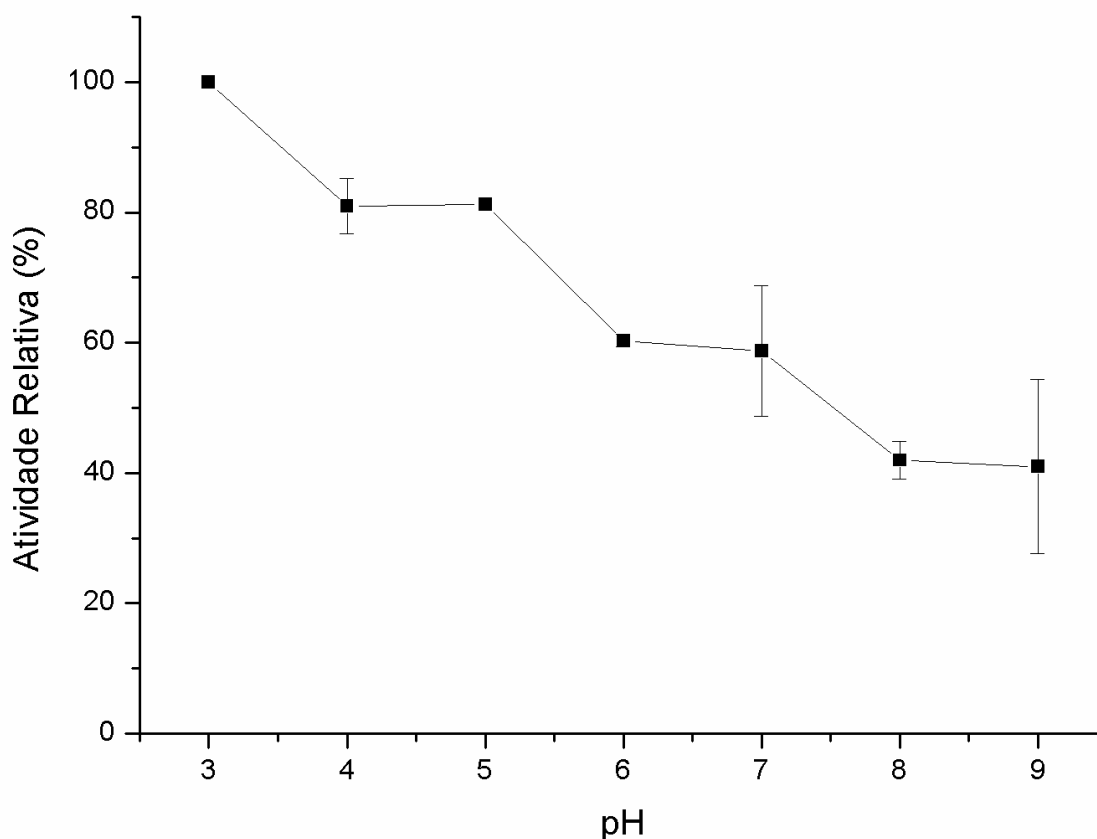
A peptidase apresentou maior atividade em pH ácido e redução progressiva da hidrólise em pH alcalino. É também observada a manutenção de 90% da atividade proteolítica a 60 °C, e aproximadamente 80% a 65 °C.

Figura 10. Efeito de temperatura na atividade da peptidase secretada por *R. miehei*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5; 5 μ M de enzima e 1 μ M de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



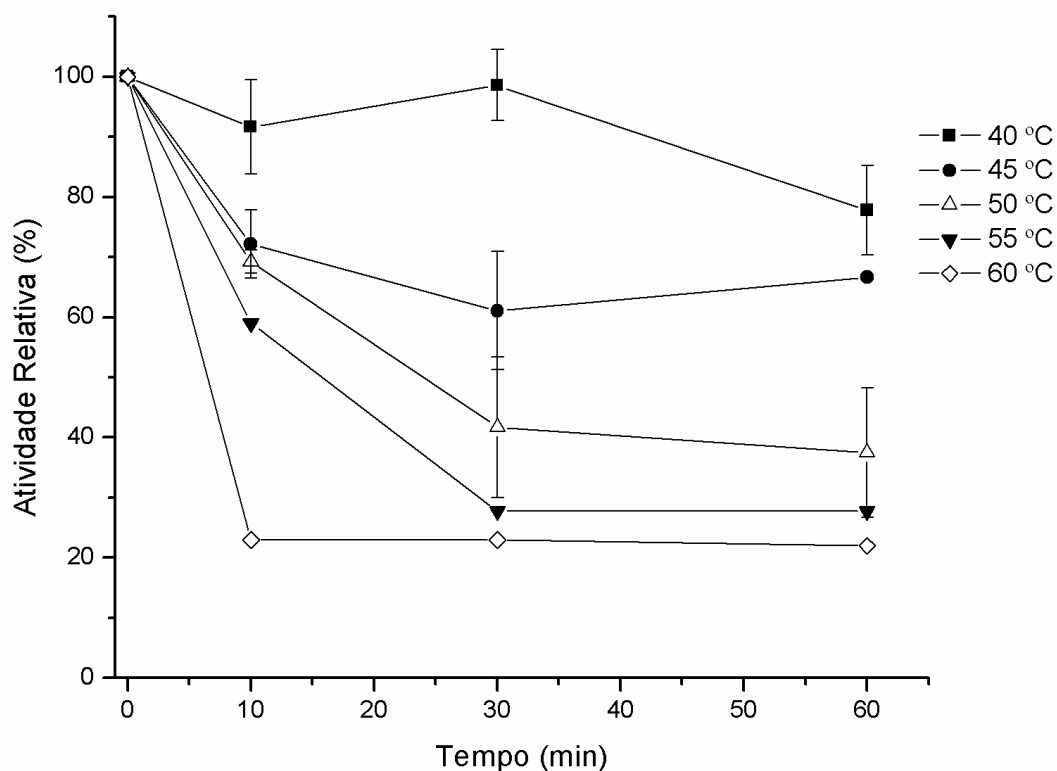
Os resultados de estabilidade (pH e temperatura) da peptidase secretada pelo fungo *R. miehei*, revelaram maior tolerância em faixa de pH ácido (3-5) apresentando 80% de atividade relativa a pH 5 e progressiva redução da atividade enzimática com incubação em condições alcalinas (por incubação de 1 hora) (**Figura 11**).

Figura 11. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por *R. miehei*. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, na faixa de pH 3-9, por 1 hora a 25 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5, a 45 °C; 5 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



A peptidase demonstrou 70% de estabilidade térmica na temperatura de 45 °C por 60 min de incubação, seguida de 40% de atividade residual a 50 °C sob as mesmas condições (**Figura 12**).

Figura 12. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por *R. miehei*. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, por 10, 30 e 60 minutos na faixa de temperatura de 40-60 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5, a 45 °C; 5 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



5.1.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por *R. miehei*

Na determinação do mecanismo da ação da peptidase, foi observado o efeito de inibidores sobre atividade enzimática. A peptidase produzida por *R. miehei* apresentou maior inibição em presença do inibidor Pepstatina A, mantendo apenas 30% de atividade residual após incubação com 0,2 mM deste inibidor (**Tabela 2**), indicando que esta peptidase é uma aspartil (aspártico) ou peptidase ácida.

Tabela 2. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por *R. miehei*

| Inibidores (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|-----------------------|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 2,0 |
| AIA | 88,0 ± 4,0 |
| PMSF | 91,0 ± 1,0 |
| EDTA | 72,0 ± 1,0 |
| Pepstatina A (0,2 mM) | 30,0 ± 2,0 |

Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

No estudo sobre efeito de íons metálicos (**Tabela 3**), estes foram avaliados como agentes químicos capazes de influenciar na atividade proteolítica. Em nossos resultados, observamos redução na atividade da peptidase aspártica após incubação com todos os sais, exceto cloreto de lítio e cloreto de sódio, cuja atividade enzimática não sofreu alteração. Em incubação com sais cloretos: cobalto, cálcio, manganês e magnésio, a peptidase apresentou atividade remanescente em torno de 40%, cloreto de potássio 56%, cloreto de bário 64% e perda quase total da atividade enzimática em incubação com cloreto de cobre II, sendo visualizada atividade remanescente de 0,3%.

Tabela 3. Efeito de íons metálicos na atividade da peptidase aspártica secretada por *R. miehei*

| Íons metálicos (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|--|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 4,7 |
| Cloreto de lítio (LiCl) | 108,0 ± 9,7 |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 96,0 ± 0,3 |
| Cloreto de bário (BaCl ₂) | 64,0 ± 4,0 |
| Cloreto de potássio (KCl) | 56,0 ± 0,4 |
| Cloreto de cálcio (CaCl ₂) | 44,0 ± 1,0 |
| Cloreto de cobalto (CoCl ₂) | 37,0 ± 0,6 |
| Cloreto de manganês (MnCl ₂) | 36,0 ± 6,0 |
| Cloreto de magnésio (MgCl ₂) | 35,0 ± 0,2 |
| Cloreto de alumínio (AlCl ₃) | 16,0 ± 0,2 |
| Cloreto de cobre II (CuCl ₂) | 0,3 ± 0,0 |

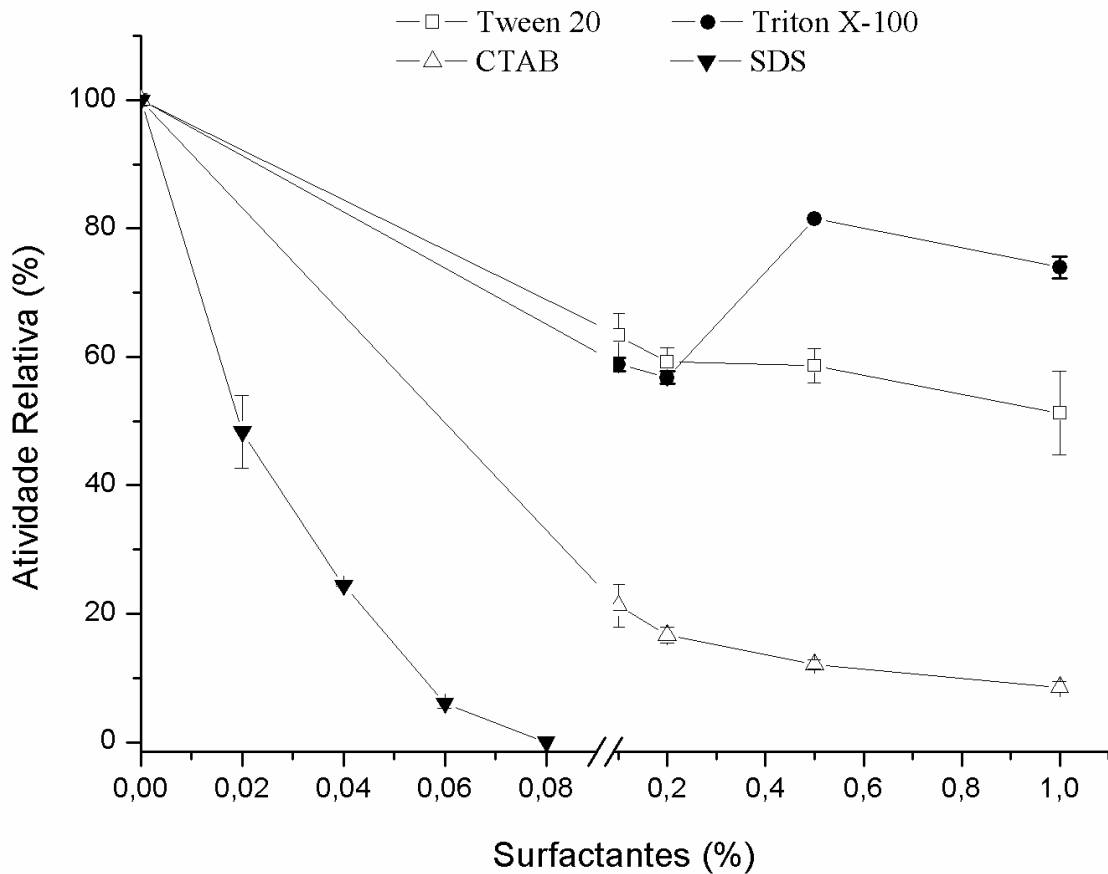
Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

5.1.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por *R. miehei*

Em nossos resultados, mostramos que a peptidase aspártica manteve aproximadamente 50% da atividade enzimática em presença de SDS à concentração de 0,02% e, perda total da atividade proteolítica a 0,08%. Na presença de CTAB, observamos atividade remanescente de 20% e 10% em concentrações de 0,1% e 1%, respectivamente (**Figura 13**).

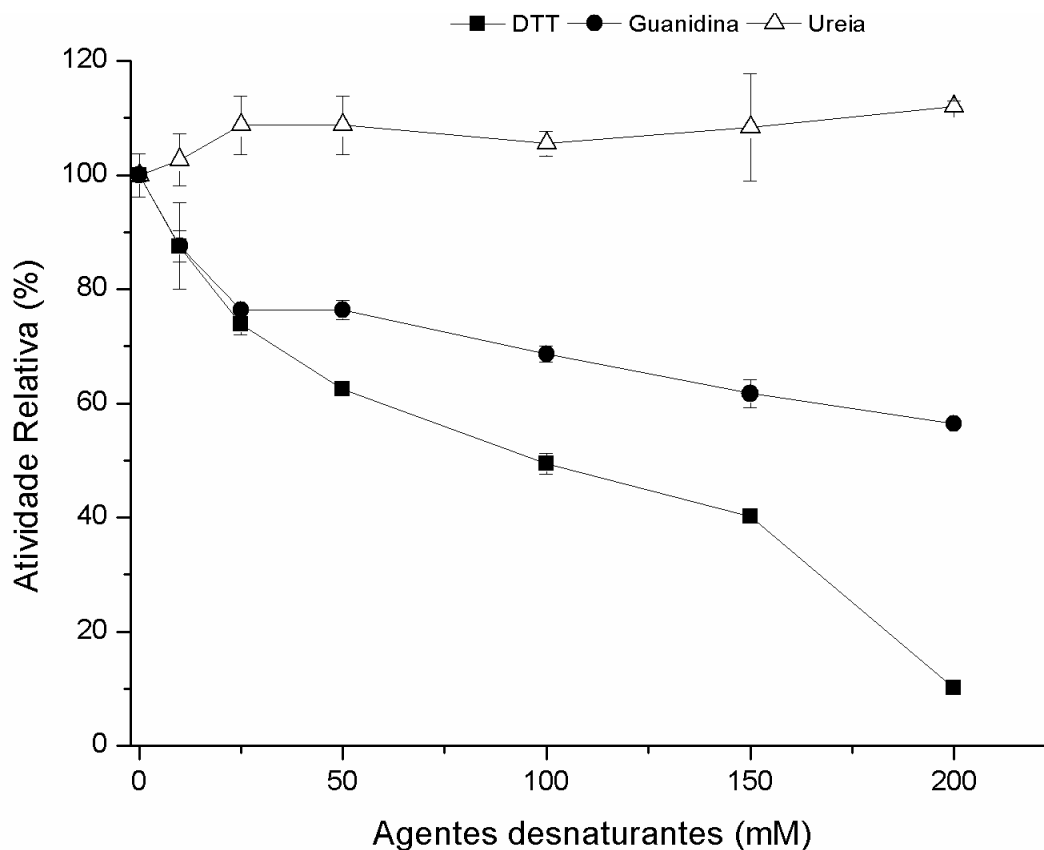
Por outro lado, os agentes tensoativos não iônicos promoveram redução menos significativa na atividade da enzima. Os resultados demonstraram cerca de 60% da atividade em relação a uma concentração de 0,2%, para ambos os agentes tensoativos não iônicos (Triton X-100 e Tween 20).

Figura 13. Efeito de surfactantes na atividade da peptidase aspártica secretada por *R. miehei*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5, a 45 °C; 5 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



No estudo com outros compostos desnaturantes, usando agente redutor, a peptidase aspártica exibiu atividade residual de 50% e 40% na concentração de 100 e 150 mM de DTT. Na incubação com o agente caotrópico guanidina, a enzima manteve cerca de 70% e 60% da atividade proteolítica para a mesma concentração molar (100 e 150 mM, respectivamente). Sob o efeito de urea a peptidase aspártica não demonstrou redução da atividade enzimática (**Figura 14**).

Figura 14. Efeito de DTT, guanidina e ureia na atividade da peptidase aspártica secretada por *R. miehei*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5, a 45 °C; 5 μ M de enzima e 1 μ M de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

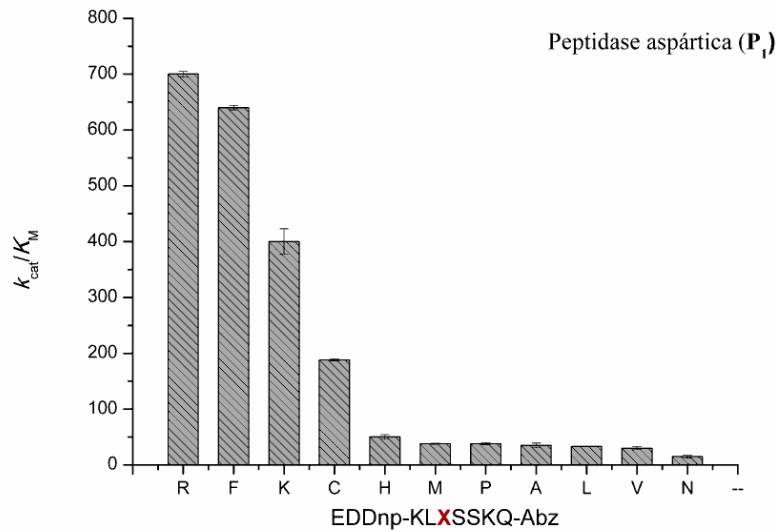


5.1.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por *R. miehei*

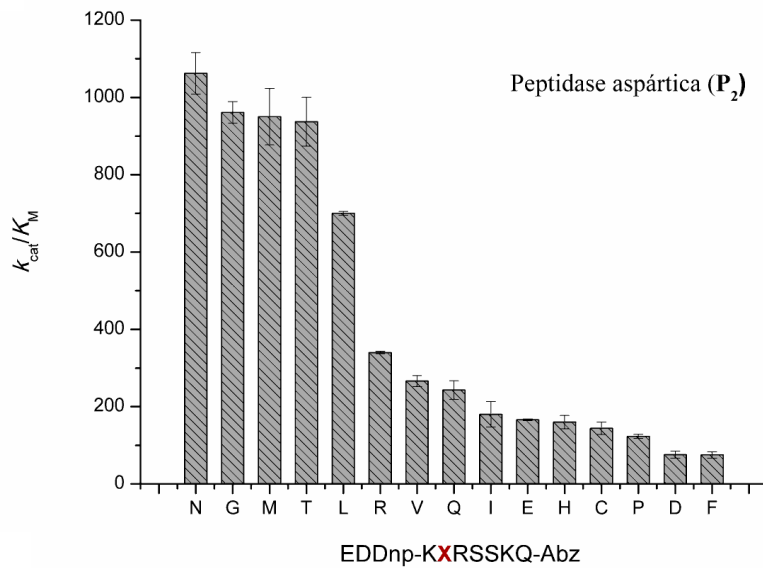
Em estudo de especificidade com troca combinatória de aminoácidos nas posições P₁, P₂ e P₃, notamos maior eficiência catalítica para aminoácidos básicos arginina (700 mM⁻¹s⁻¹) e lisina (400 mM⁻¹s⁻¹) e, apolar aromático fenilalanina (640 mM⁻¹s⁻¹) avaliados em P₁ (**Figura 15 A**). Em P₂ (**Figura 15 B**), a maior aceitação de hidrólise foi para substrato contendo aminoácidos polares neutros, asparagina e treonina, e apolares, glicina (cadeia curta), leucina e metionina (cadeia longa). Em P₃, destaca-se preferência na hidrólise quando aminoácidos básicos, lisina (700 mM⁻¹s⁻¹) e arginina (350 mM⁻¹s⁻¹) e apolar isoleucina (333,5 mM⁻¹s⁻¹) ocuparam esta posição (**Figura 15 C**). O Apêndice 1 (**A1**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P₁, P₂ e P₃.

Figura 15. Especificidade da peptidase aspártica avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptídeo FRET. Variação de aminoácidos nas posições “X”, P₁ (A), P₂ (B) e P₃ (C).

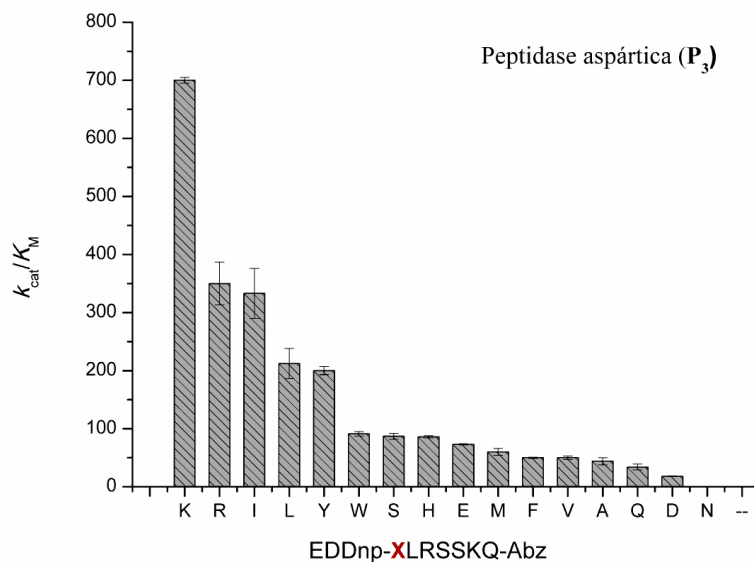
A



B

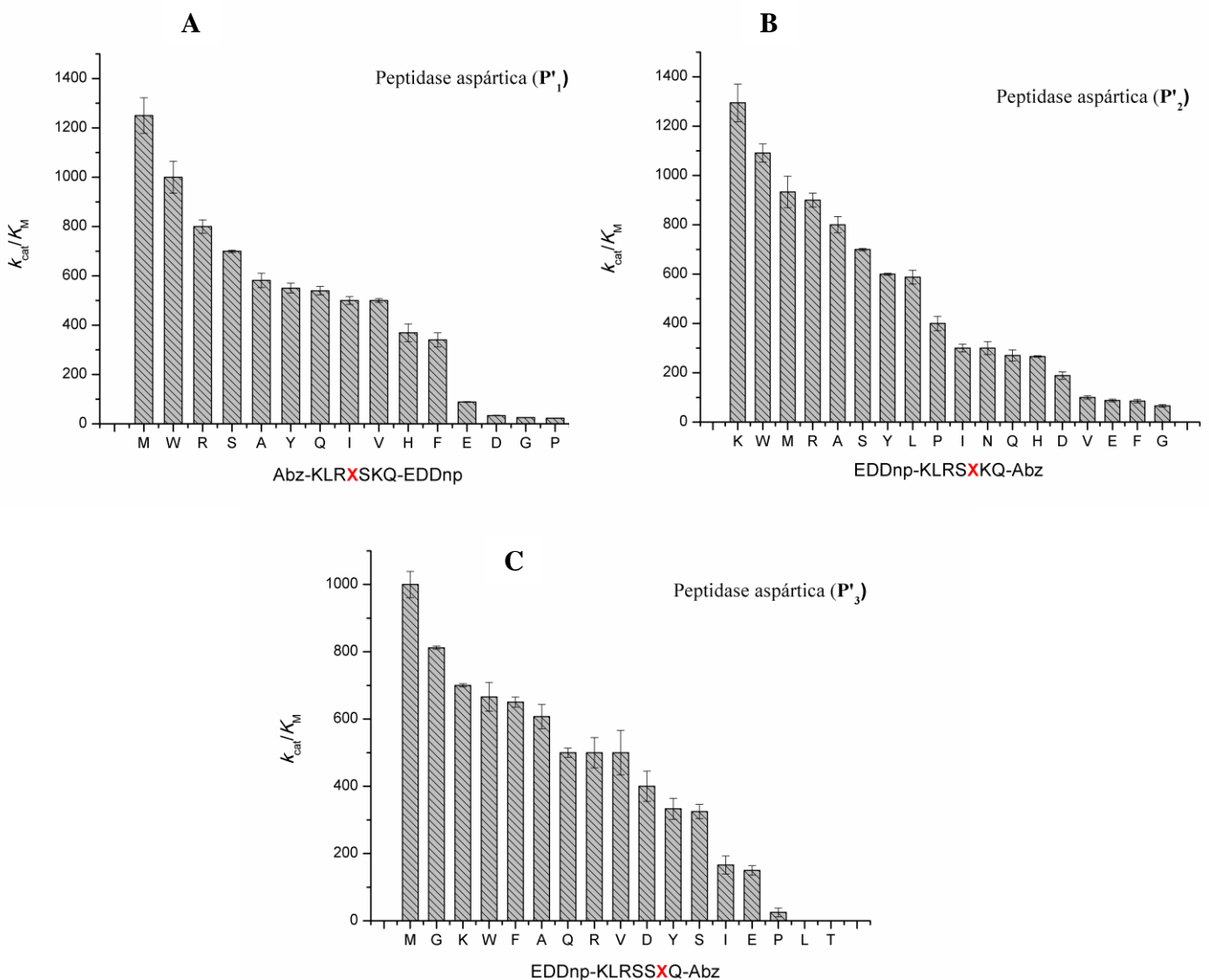


C



Em estudo nas posições P₁, P₂ e P₃ a peptidase aspártica exibiu alta eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) relativa aos aminoácidos apolares, com destaque para metionina (M) e alanina (A) em todas as posições. Observou-se também uma elevada catálise para aminoácidos aromáticos avaliados em P₁ (W e Y); S₂ (W e Y) e S₃ (F e W) (**Figura 16 A, B e C**). O Apêndice 2 (**A2**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P₁, P₂ e P₃.

Figura 16. Especificidade da peptidase aspártica avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptideo FRET. Variação de aminoácidos nas posições “X”, P₁ (**A**), P₂ (**B**) e P₃ (**C**).



Observamos também, altos valores de eficiência catalítica para aminoácidos básicos: P'₁ (R); P'₂ (K e R) e P'₃ (K) e aminoácido polar neutro, serina e tirosina (polar aromático). Por outro lado, a peptidase aspártica apresentou baixa aceitação a aminoácidos ácidos (D e E), prolina (P) e glicina (G), exceto em P'₃. No entanto, na análise comparativa, apesar dos baixos valores de eficiência catalítica, é possível apontar uma maior aceitação para aminoácidos ácidos em P'₃, tendo sido a posição mais inespecífica na catálise, apresentando atividade proteolítica moderada e alta com aminoácidos apolares, polar neutro, ácido e básicos.

Em resumo, aponta-se que os maiores valores de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) da peptidase aspártica foram observados para aminoácidos avaliados nas posições P': metionina ($1.250 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) em P'₁; lisina ($1.294 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) e triptofano ($1.091 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) em P'₂, e metionina ($1.000 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) em P'₃.

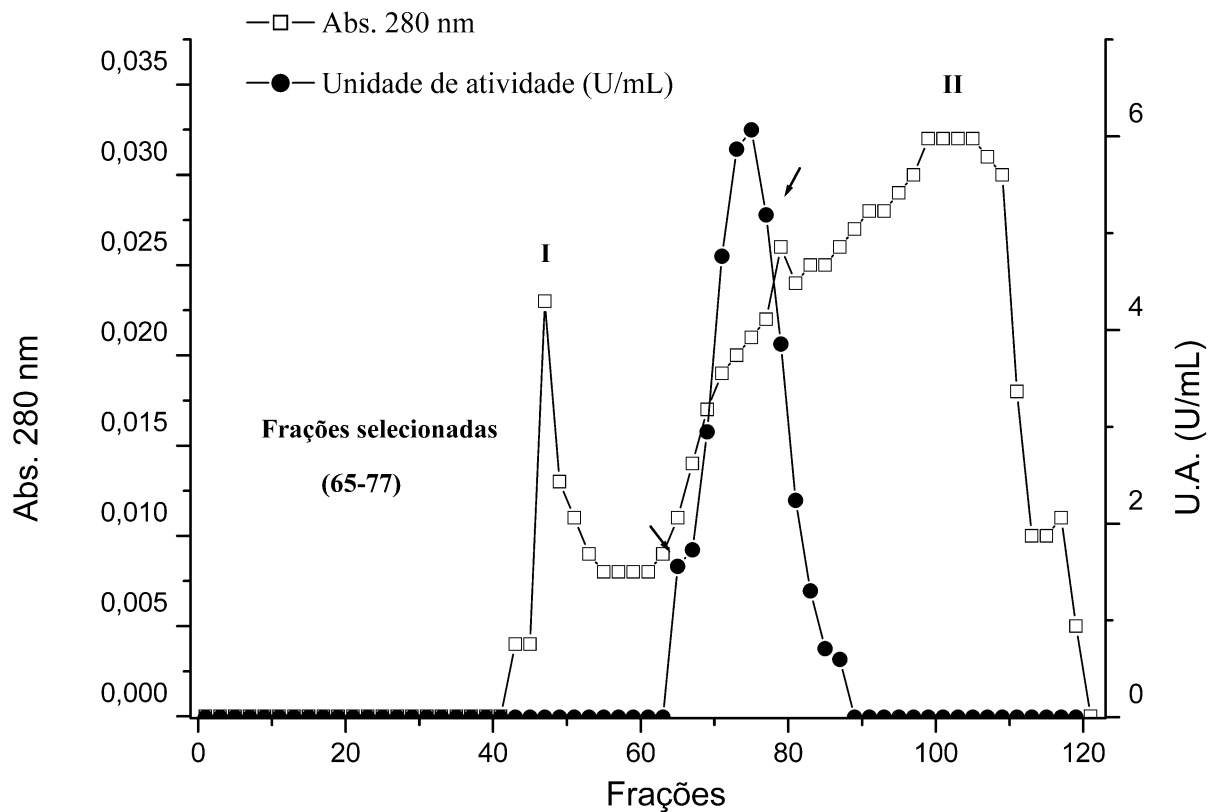
5.2 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso *P. chrysosporium*

5.2.1 Purificação

Estudos cromatográficos com extrato bruto de BSm do fungo *P. chrysosporium* foram inicialmente realizados em cromatografia de exclusão molecular utilizando resina Sephadex G-50.

Conforme a **Figura 17**, o cromatograma mostrou dois picos proteicos (I e II) em absorção a 280 nm, e a atividade proteolítica foi detectada em frações entre os dois picos. Após análise por SDS-PAGE 12%, as frações com semelhante perfis eletroforéticos (tubos 65-77) foram reunidas e dialisadas em tampão acetato de sódio pH 4,5 (0,05 M).

Figura 17. Cromatograma do extrato bruto proveniente de BSm do fungo *P. chrysosporium* aplicado em resina Sephadex G-50 (coluna 100 cm x 4 cm). Tampão acetato de sódio (0,05 M) + NaCl (0,05 M), pH 5. Vazão de eluição correspondente a 0,6 mL/min e volume de coleta de 5 mL.



Em seguida, a amostra foi aplicada em cromatografia de troca iônica (resina Source 15S). Conforme **figura 18**, o perfil cromatográfico mostrou duas regiões de teor proteico e atividade proteolítica, frações de proteínas não adsorvidas, pico I, e proteínas adsorvidas e eluídas da resina, pico II.

Em análise por SDS-PAGE 12%, observamos a peptidase pura na fração 20, com massa molecular estimada em 23 kDa (**Figura 19**). A eluição da peptidase ocorreu em aproximadamente 29% de gradiente salino do tampão B (Tampão acetato de sódio 0,05 M + 0,2 M de NaCl, pH 4,5).

Figura 18. Cromatograma em resina catiônica Source 15S (coluna 10 cm x 1 cm), peptidase secretada pelo fungo *P. chrysosporium*. Amostra proveniente da cromatografia com resina Sephadex G-50. Tampão A (acetato de sódio, 0,05 M, pH 4,5) e tampão B (acetato de sódio, 0,05 M, pH 4,5 + 0,2 M NaCl). Vazão de eluição correspondente a 1 mL/min e volume de coleta de 1,5 mL.

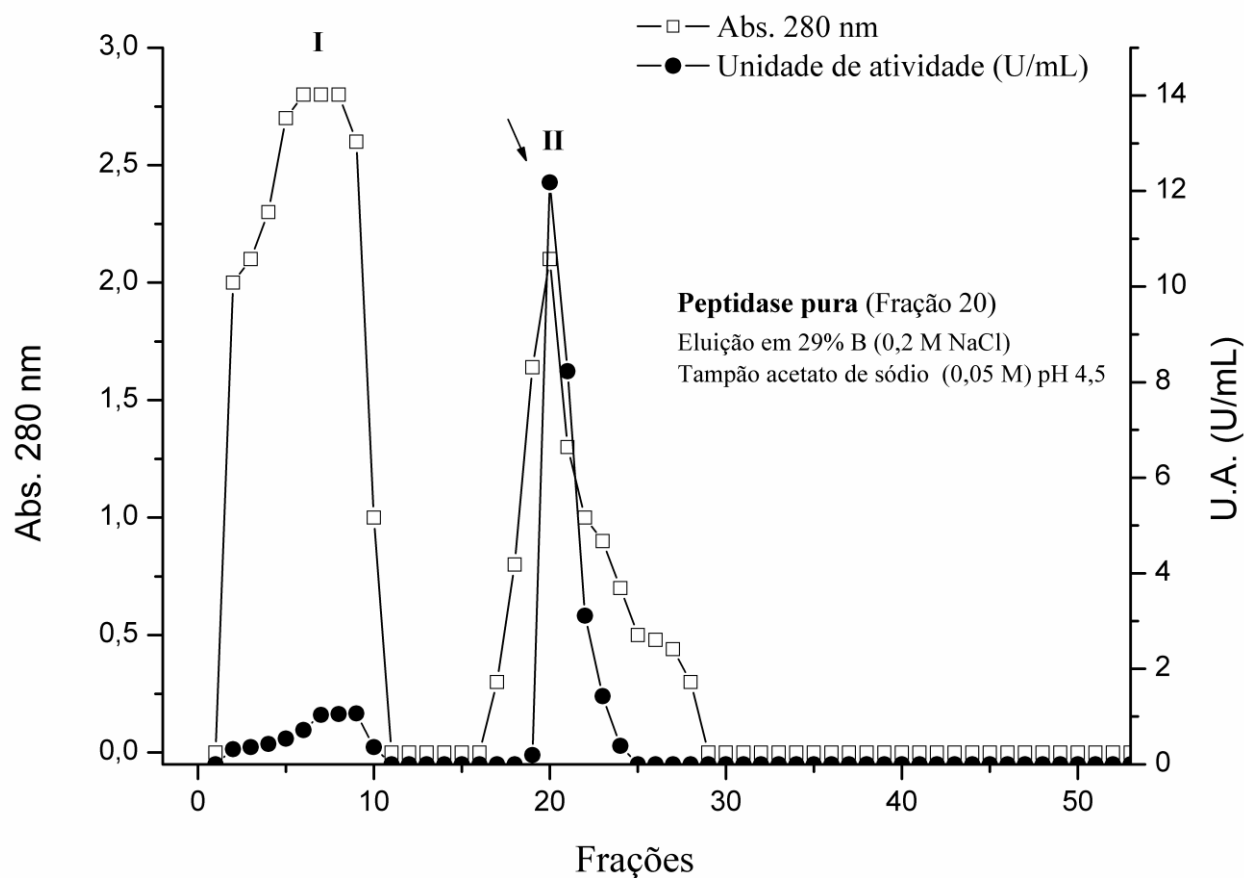
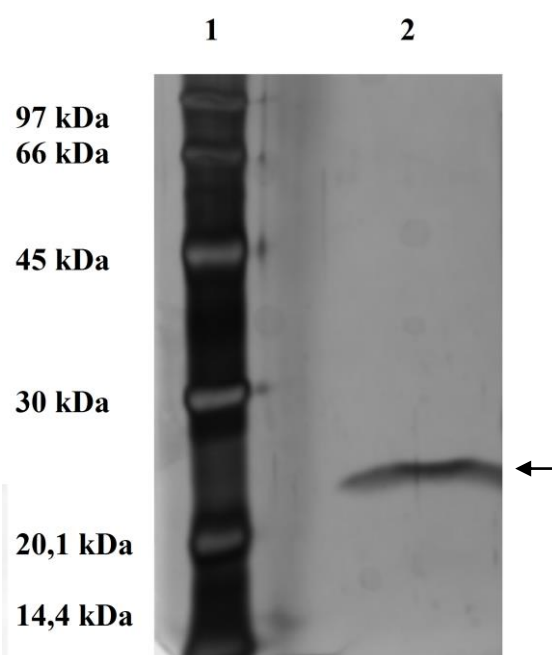


Figura 19. SDS-PAGE 12%. Peptidase secretada pelo fungo *P. chrysosporium*. Marcador de massa molecular (1) e peptidase pura (2). As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



Todos os passos de purificação desta peptidase foram relacionados na **tabela 4**, cujo rendimento final foi de 11% e purificação de aproximadamente 5,7 vezes.

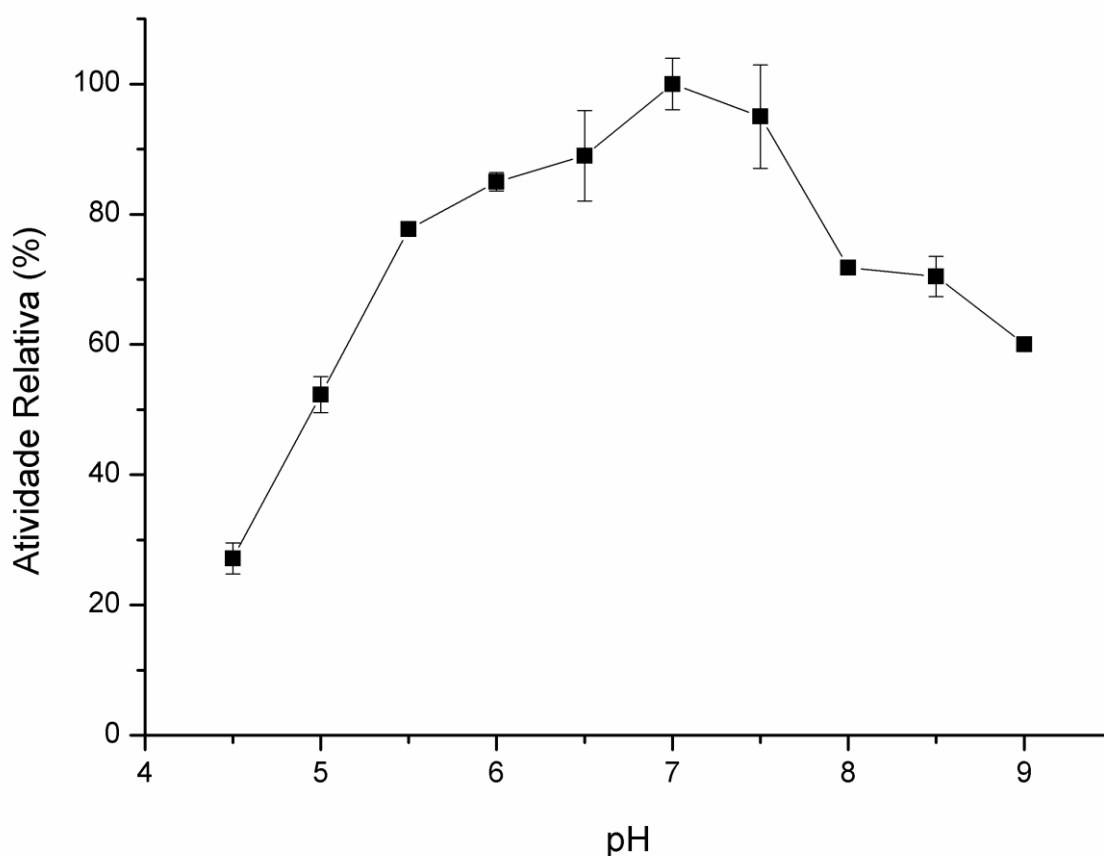
Tabela 4. Sumário de purificação da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

| Etapas de purificação | Atividade total (U.A.) | Proteína total (mg) | Atividade específica (U.A./mg) | Purificação | Rendimento (%) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| Extrato bruto (BSm) | 16.306,0 | 127,0 | 128,5 | 1,00 | 100,0 |
| Extrato concentrado | 7.794,0 | 52,5 | 148,5 | 1,15 | 48,0 |
| Sephadex G-50 | 7.485,0 | 46,5 | 161,0 | 1,25 | 46,0 |
| Source 15S | 1.762,5 | 2,4 | 734,5 | 5,70 | 11,0 |

5.2.2. Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

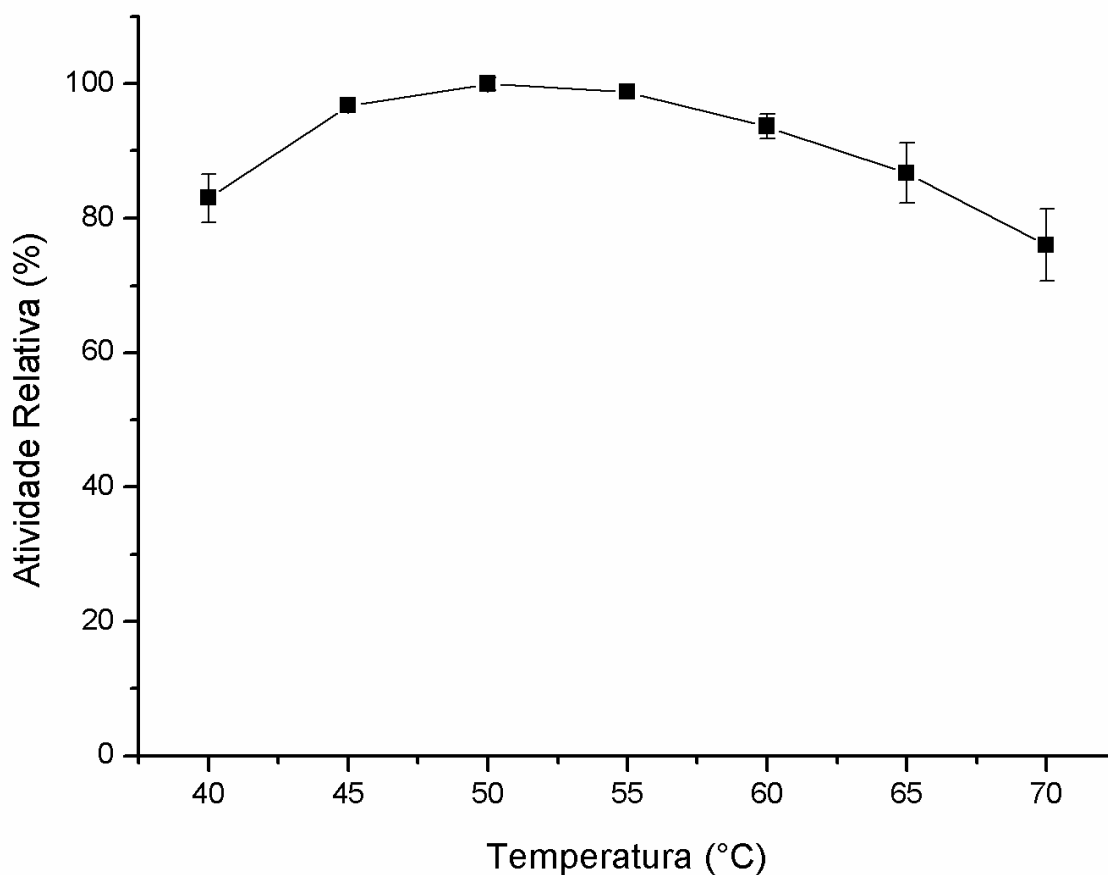
Para peptidase produzida por *P. chrysosporium*, a máxima atividade proteolítica foi alcançada a pH 7. Conforme **figura 20**, também observamos alta atividade enzimática, acima de 80%, na faixa de pH 5,5 a 7,5.

Figura 20. Efeito de pH na atividade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: temperatura de 45 °C; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



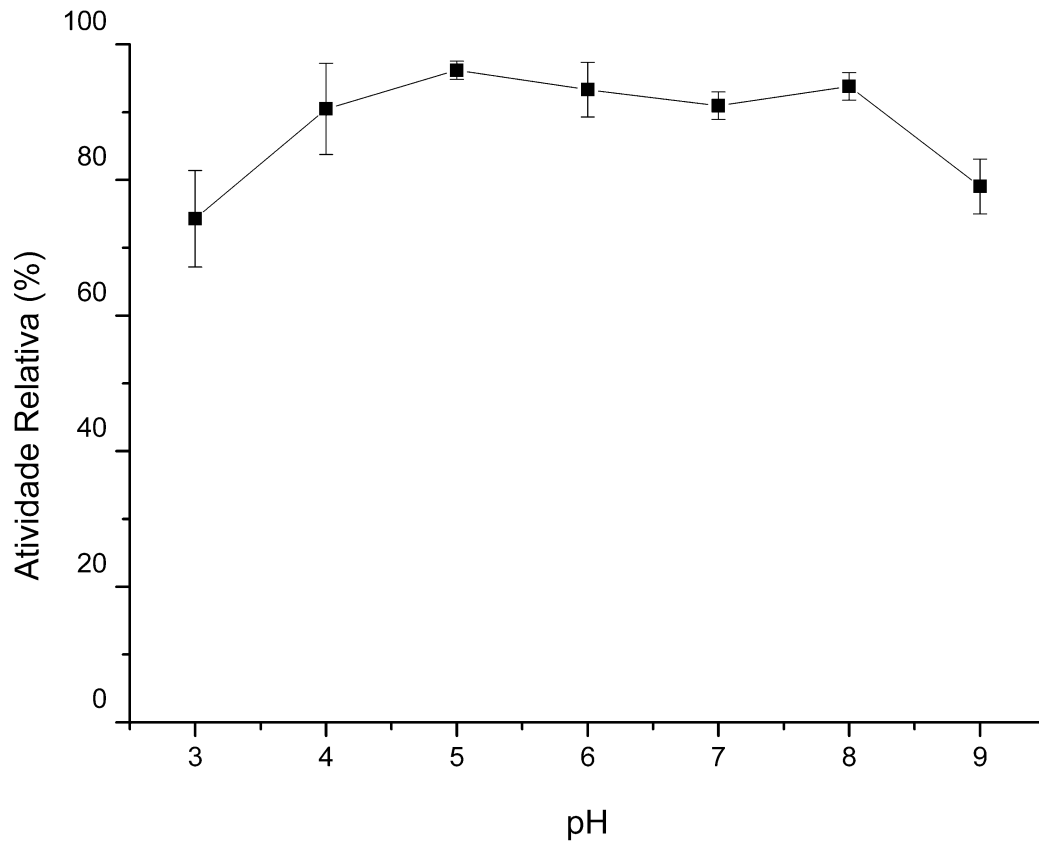
Sob efeito de temperatura, na faixa avaliada, notamos melhor desempenho da enzima entre 45-55 °C (**Figura 21**). Esta peptidase mostrou elevado nível de atividade em temperaturas acima de 55 °C, sendo observado 75% de atividade remanescente a 70 °C.

Figura 21. Efeito de temperatura na atividade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



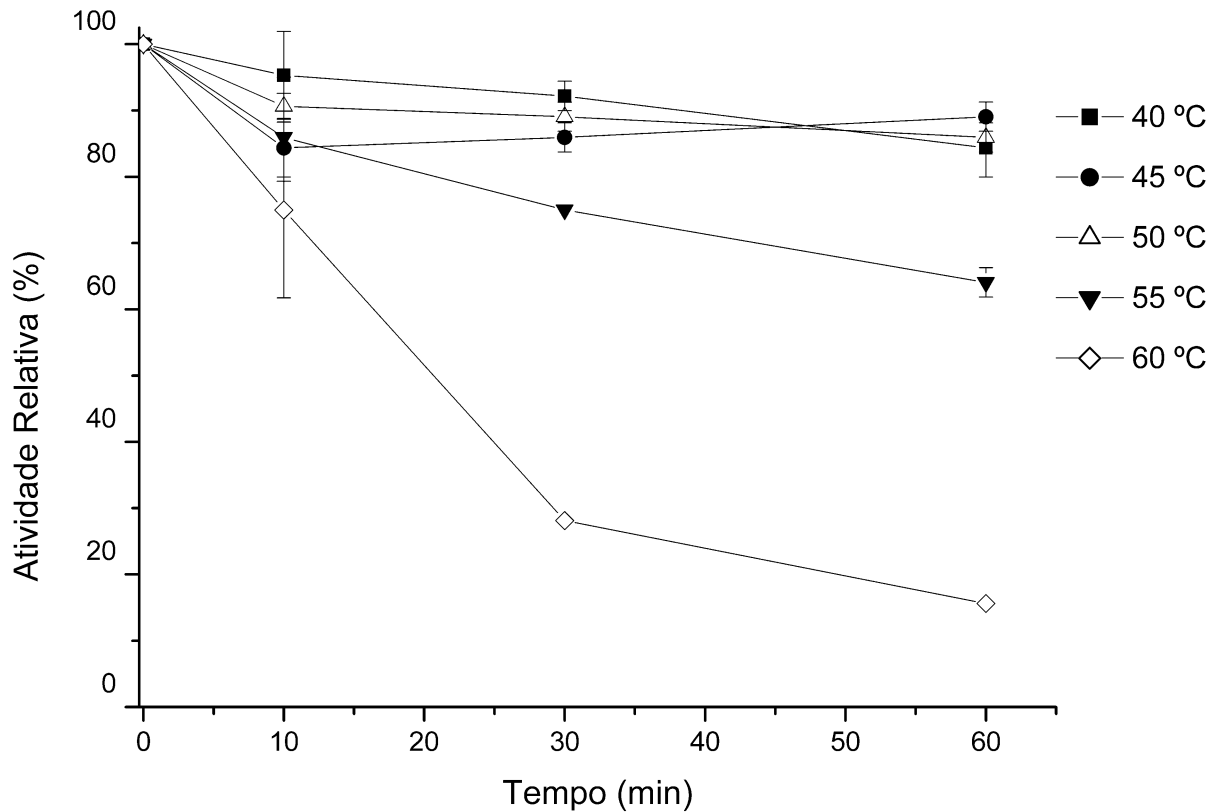
No que diz respeito à estabilidade sob efeito de pH, a peptidase secretada por *P. chrysosporium* mostrou-se estável em condições ácidas e alcalinas, tendo sido mantida atividade relativa acima de 80% na faixa de pH 4 a 8 (**Figura 22**).

Figura 22. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, na faixa de pH 3-9, por 1 hora a 25 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



Em estudo com incubação da enzima em diferentes temperaturas, notamos estabilidade térmica em temperatura até 55 °C, tendo sido notada atividade relativa de aproximadamente 90% até 50 °C e 70% a 55 °C por 60 min de incubação (**Figura 23**).

Figura 23. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, por 10, 30 e 60 minutos na faixa de temperatura de 40-60 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



5.2.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

No estudo sobre o modo de ação da peptidase, foi possível observar a inibição promovida por AIA e NEM (5 mM), sendo visualizada atividade remanescente de 38% e 1,5%, respectivamente. Estes resultados sugerem que a peptidase produzida por *P. chrysosporium* é uma cisteíno peptidase, cuja enzima foi inibida por dois inibidores específicos de cisteíno ou tiol peptidase (**Tabela 5**).

Tabela 5. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

| Inibidores (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|-------------------|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 0,4 |
| PMSF | 95,0 ± 0,2 |
| EDTA | 97,0 ± 3,0 |
| AIA | 38,0 ± 5,0 |
| NEM | 1,5 ± 0,5 |

Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

Sob o efeito de íons metálicos, em cisteíno peptidase foi verificada ligeira redução da atividade enzimática em incubação com cloretos de lítio, sódio, potássio, cálcio e magnésio, cuja atividade relativa foi mantida na faixa de 85-96%. Cloretos de bário e manganês, aproximadamente 75%; cloretos de cobalto e alumínio, 55% de atividade remanescente, e perda quase total da atividade enzimática em incubação com cloreto de cobre II (**Tabela 6**).

Tabela 6. Efeito de íons metálicos na atividade da cisteíno peptidase secretada por *P. chrysosporium*

| Íons metálicos (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|--|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 6,0 |
| Cloreto de lítio (LiCl) | 96,0 ± 2,0 |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 95,0 ± 6,0 |
| Cloreto de potássio (KCl) | 86,0 ± 3,0 |
| Cloreto de cálcio (CaCl ₂) | 86,0 ± 0,6 |
| Cloreto de magnésio (MgCl ₂) | 85,0 ± 0,7 |
| Cloreto de bário (BaCl ₂) | 75,0 ± 4,0 |
| Cloreto de manganês (MnCl ₂) | 73,0 ± 3,4 |
| Cloreto de cobalto (CoCl ₂) | 55,0 ± 0,6 |
| Cloreto de alumínio (AlCl ₃) | 55,0 ± 1,4 |
| Cloreto de cobre II (CuCl ₂) | 0,7 ± 0,0 |

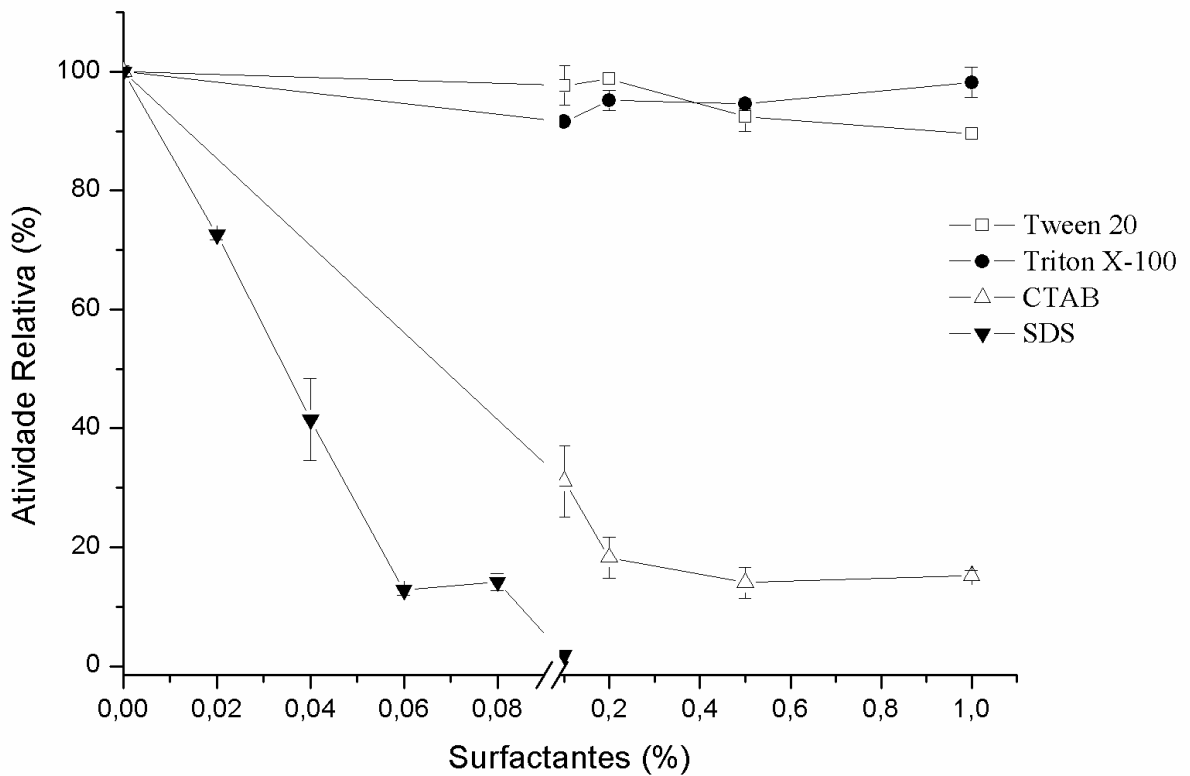
Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

5.2.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

No estudo sobre efeito de surfactantes em cisteíno peptidase, notamos que não houve redução significativa da atividade enzimática em presença de surfactantes não iônicos (Tween 20 e Triton X-100). Contudo, observamos uma intensa diminuição da atividade enzimática conforme o aumento progressivo da concentração de surfactantes iônicos (CTAB e SDS).

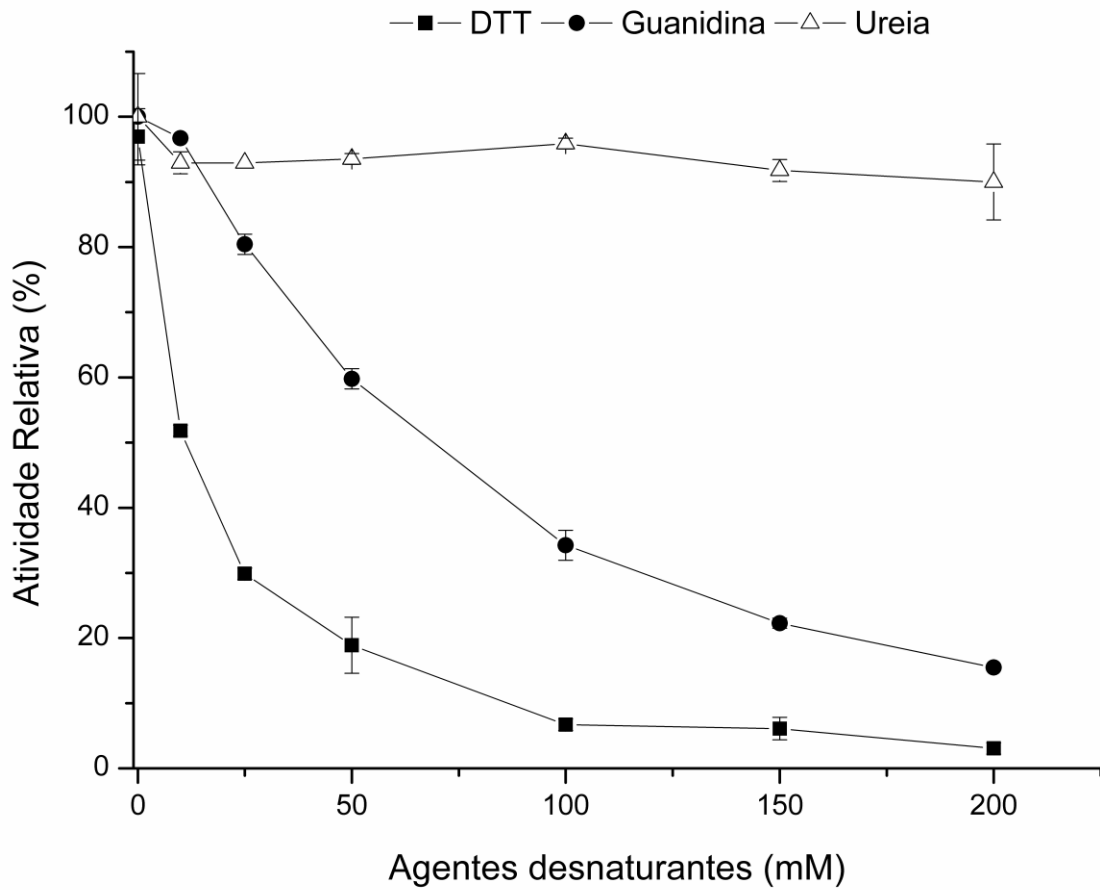
Em incubação com 0,04% de SDS, a peptidase perdeu mais da metade de sua atividade enzimática, sendo observados 40% de atividade remanescente. Ao comparar o efeito de SDS e CTAB, observamos atividade relativa de aproximadamente 30% quando a peptidase foi incubada com CTAB e uma perda total da atividade proteolítica em presença de SDS, ambos a concentração de 0,1% (**Figura 24**).

Figura 24. Efeito de surfactantes na atividade da cisteíno peptidase secretada por *P. chrysosporium*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



Sob o efeito dos agentes desnaturantes DTT, guanidina e ureia, a cisteíno peptidase demonstrou proteólise em presença de guanidina e maior desnaturação em incubação com DTT, cuja atividade relativa foi de aproximadamente 35% e 7%, respectivamente, ambos a 100 mM. Nota-se o maior efeito desnaturante causado por DTT, cuja atividade proteolítica foi reduzida a 50% em incubação com 10 mM, e diminuição progressiva em concentrações mais elevadas desse agente redutor. Em destaque foi visualizada atividade relativa de 15% (guanidina) e 3% (DTT) em 200 mM. Na presença de urea, nas concentrações estudadas, esta enzima não demonstrou redução significativa da atividade proteolítica (**Figura 25**).

Figura 25. Efeito de DTT, guanidina e ureia sobre a atividade da cisteíno peptidase secretada por *P. chrysosporium*. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 3 µM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

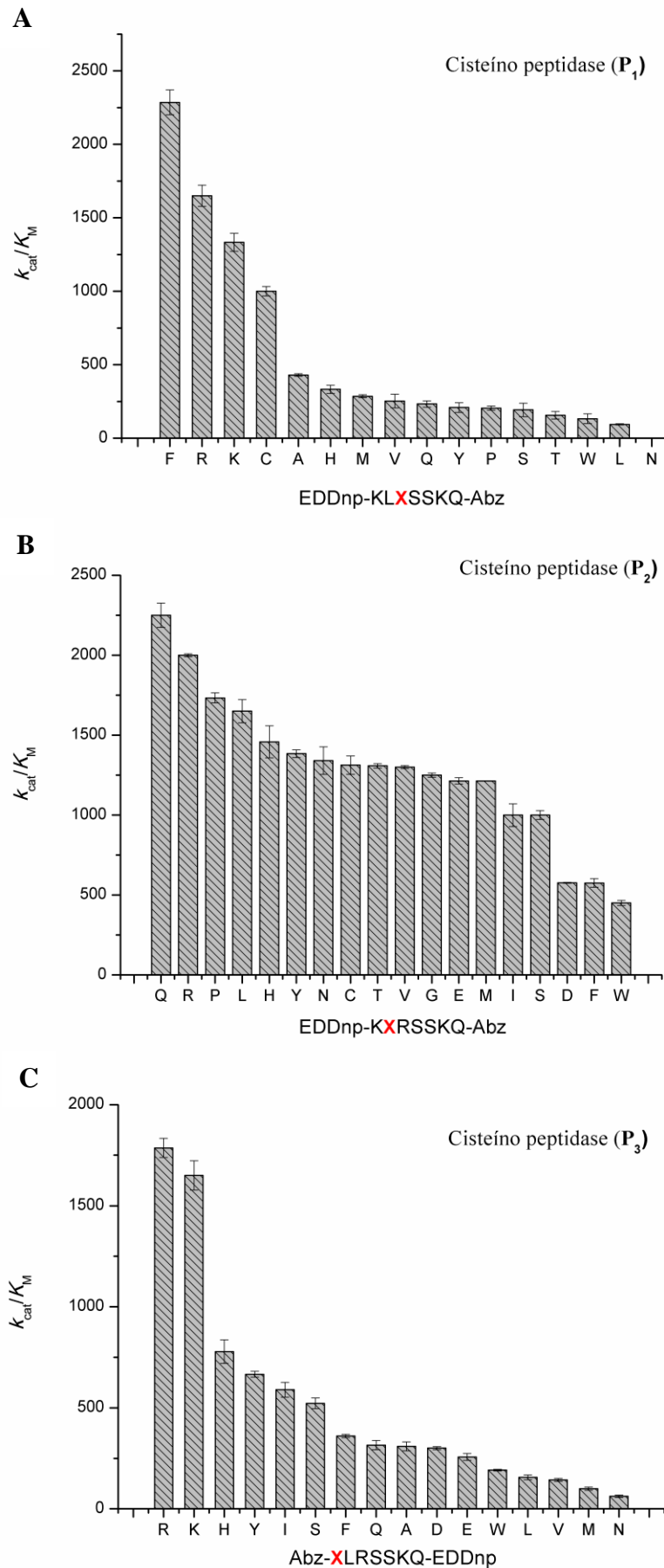


5.2.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por *P. chrysosporium*

A cisteíno peptidase descrita em nosso trabalho apresentou características catalíticas interessantes, principalmente para aminoácidos avaliados nas posições P₃ e P'₃.

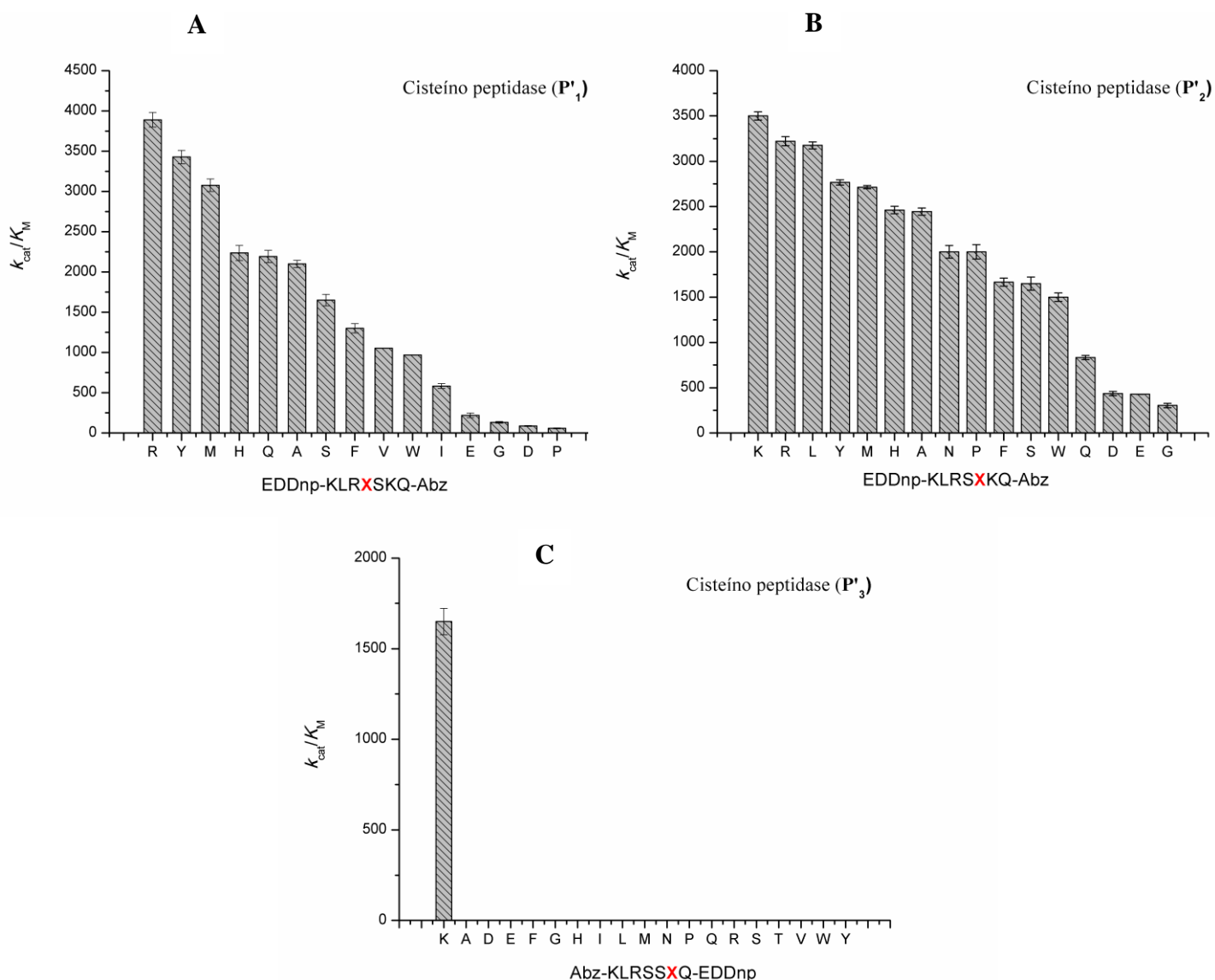
No que diz respeito ao estudo nas outras posições, salienta-se: P₁ (**Figura 26 A**), alto valor de eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) para fenilalanina (2.286 mM⁻¹s⁻¹), arginina (1.650 mM⁻¹s⁻¹) e lisina (1.333,5 mM⁻¹s⁻¹). Variações em P₂ (**Figura 26 B**) apresentaram grande generalidade de hidrólise, tendo sido observado altas performances catalíticas com vários resíduos avaliados nesta posição, como glutamina (2.250 mM⁻¹s⁻¹), arginina (2.000 mM⁻¹s⁻¹), prolina (1.733,5 mM⁻¹s⁻¹), leucina (1.650 mM⁻¹s⁻¹), histidina (1.458,5 mM⁻¹s⁻¹), tirosina (1.384,5 mM⁻¹s⁻¹), asparagina (1.340 mM⁻¹s⁻¹) e treonina (1.308 mM⁻¹s⁻¹). Na posição P₃, **Figura 26 C**, a enzima apresentou maior eficiência catalítica para aminoácidos básicos: arginina (1.786 mM⁻¹s⁻¹), lisina (1.650 mM⁻¹s⁻¹) e histidina (778 mM⁻¹s⁻¹), seguido por tirosina (666,5 mM⁻¹s⁻¹), isoleucina (589,5 mM⁻¹s⁻¹) e serina (522,5 mM⁻¹s⁻¹). O Apêndice 3 (**A3**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P₁, P₂ e P₃.

Figura 26. Especificidade da cisteíno peptidase avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptideo FRET. Variação de aminoácidos nas posições “X”, P₁ (A), P₂ (B) e P₃ (C).



Como mostrado na **Figura 27**, nas posições P'₁ e P'₂ foram visualizados um grande espectro de catálise dos substratos para diferentes tipos de aminoácidos substituídos nestas posições, tais como a arginina (3.889 mM⁻¹s⁻¹), tirosina (3.428,5 mM⁻¹s⁻¹) e metionina (3.077 mM⁻¹s⁻¹) em P'₁ (**Figura 27 A**), e lisina (3.500 mM⁻¹s⁻¹), arginina (3.222 mM⁻¹s⁻¹), leucina (3.176,5 mM⁻¹s⁻¹), tirosina (2.766,5 mM⁻¹s⁻¹) e metionina (2.714 mM⁻¹s⁻¹) em P'₂ (**Figura 27 B**). O Apêndice 4 (**A4**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P'₁, P'₂ e P'₃.

Figura 27. Especificidade da cisteíno peptidase avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptídeo FRET. Variação de aminoácidos nas posições "X", P'₁ (A), P'₂ (B) e P'₃ (C).



De acordo com substituição de aminoácidos em cada posição no substrato sintético, podemos notar, no geral, a alta preferência por resíduos básicos (H, K e R) em todas as posições, destacando P₃, e especialmente P'₃, cuja catálise enzimática é restrita (limitada) ao resíduo de lisina, não tendo sido observada hidrólise na ausência deste aminoácido (K) nesta posição (**Figura 27 C**).

Vários ensaios cinéticos foram realizados utilizando todos os aminoácidos em P'₃ e não foi observada hidrólise na ausência de lisina ocupando esta posição. Além disso, a peptidase demonstrou baixa catálise com aminoácidos ácidos (D e E) avaliados nas diferentes posições no substrato.

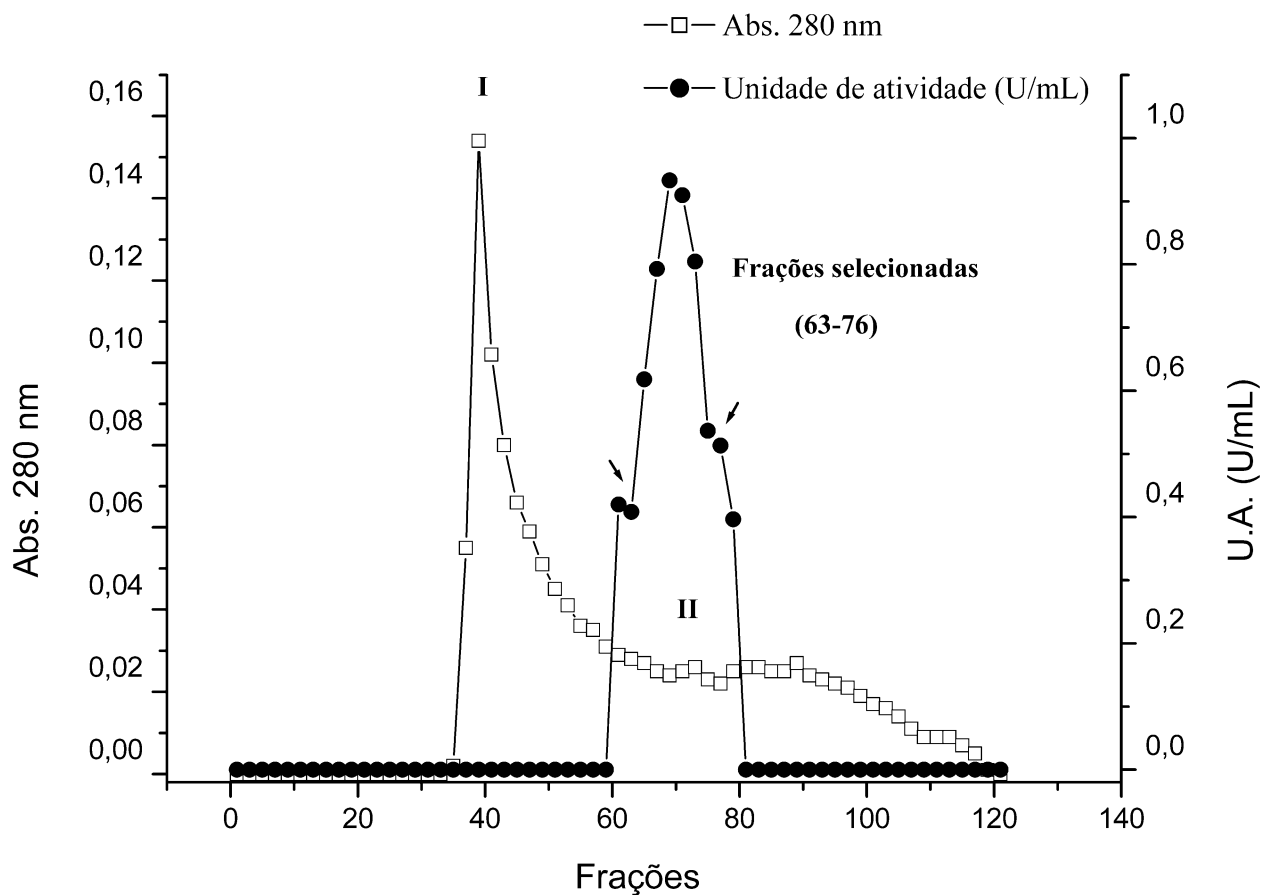
5.3 Peptidase secretada pelo fungo filamentoso *Leptosphaeria* sp.

5.3.1 Purificação

Similarmente a metodologia de purificação da cisteíno peptidase, os processos cromatográficos para peptidase proveniente do BSm do fungo *Leptosphaeria* sp. foram realizados utilizando cromatografia de exclusão molecular e troca iônica.

Inicialmente, o extrato bruto foi concentrado e aplicado em resina Sephadex G-50. O cromatograma demonstrou o perfil de eluição protéica com um pico (I) e uma faixa de frações subsequentes (II), onde a atividade proteolítica foi detectada (**Figura 28**).

Figura 28. Cromatograma do extrato bruto proveniente de BSm com o fungo *Leptosphaeria* sp. e aplicado em resina Sephadex G-50 (coluna 100 cm x 4 cm). Tampão acetato de sódio (0,05 M) + NaCl (0,05 M), pH 5. Vazão de eluição correspondente a 0,6 mL/min e volume de coleta de 5 mL.



Após análise por SDS-PAGE 12%, as frações com semelhante perfis eletroforéticos (tubos 63-76), foram reunidas, dialisadas em tampão acetato de sódio (0,05 M), pH 4,5, e aplicadas em resina catiônica Source 15S (troca iônica).

O perfil cromatográfico mostrou quatro picos proteicos e a obtenção da peptidase pura no pico III, frações 29 e 30, eluídas a 31% de tampão B (tampão acetato de sódio (0,05 M) pH 4,5 + 0,2 mM de NaCl) (**Figura 29**).

Em resumo da purificação e SDS-PAGE 12%, verificamos um rendimento final de 3,5%, purificação de 7 vezes (**Tabela 7**) e enzima pura apresentando massa molecular estimada (por SDS-PAGE 12%) em 35 kDa (**Figura 30**).

Figura 29. Cromatograma em resina catiônica Source 15S (coluna 10 cm x 1 cm), peptidase secretada pelo fungo *Leptosphaeria* sp. Amostra proveniente da cromatografia com resina Sephadex G-50. Tampão A (acetato de sódio, 0,05 M, pH 4,5) e tampão B (acetato de sódio, 0,05 M, pH 4,5 + 0,2 M NaCl). Vazão de eluição correspondente a 1 mL/min e volume de coleta de 1,5 mL.

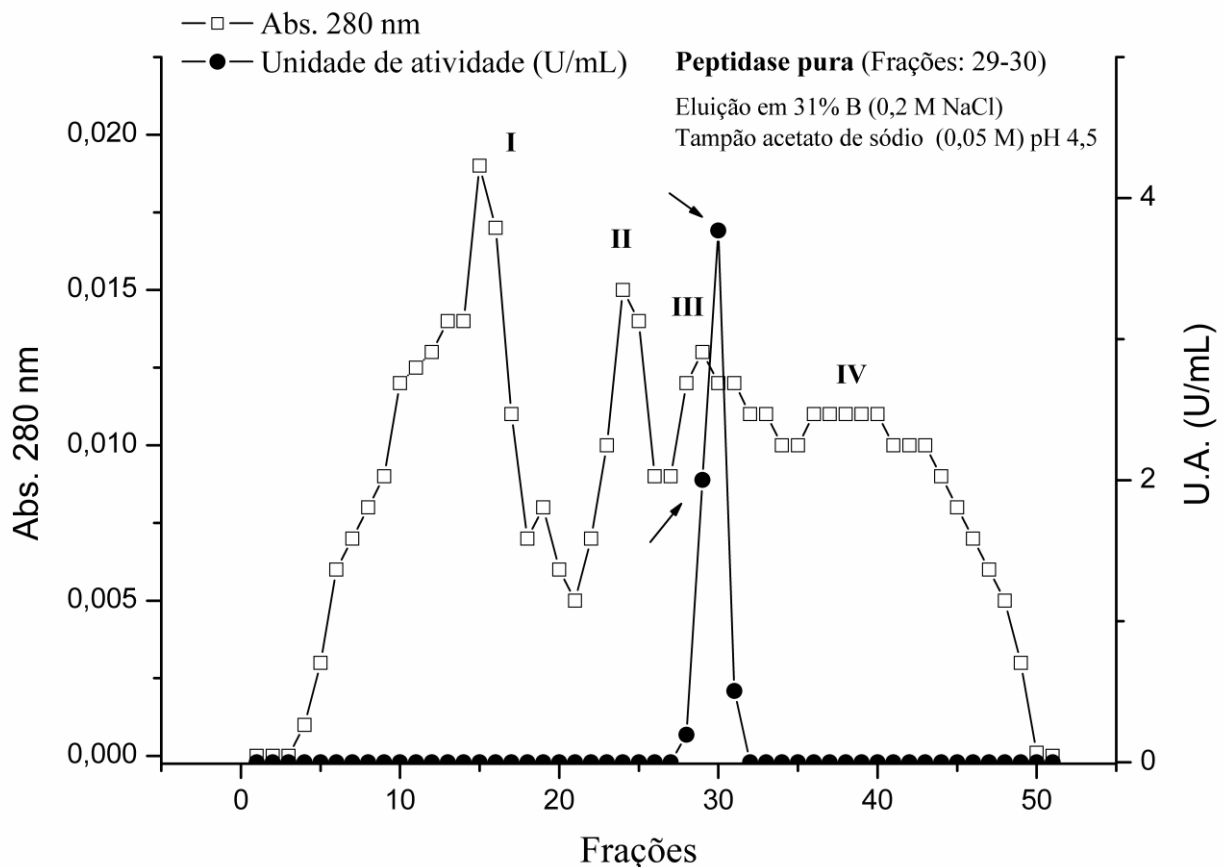
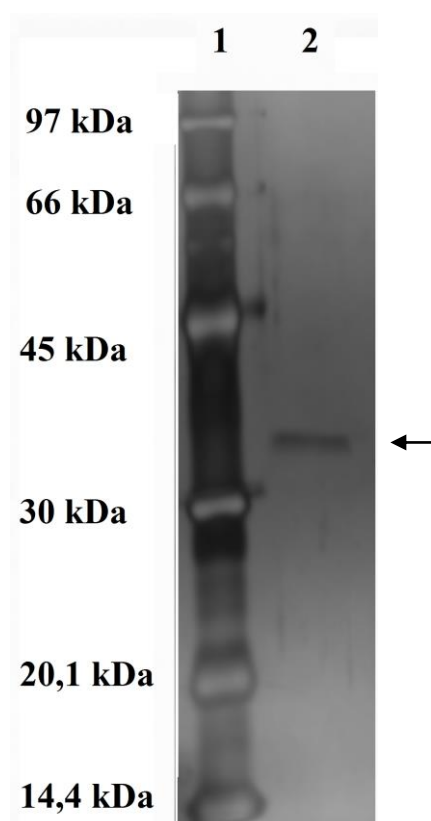


Tabela 7 Sumário de purificação da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

| Etapas de purificação | Atividade total (U.A.) | Proteína total (mg) | Atividade específica (U.A./mg) | Purificação | Rendimento (%) |
|-----------------------|------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|----------------|
| Extrato bruto (BSm) | 3.912,0 | 41,0 | 95,5 | 1,0 | 100,0 |
| Extrato concentrado | 3.687,0 | 37,0 | 100,0 | 1,0 | 94,0 |
| Sephadex G-50 | 2.410,0 | 6,8 | 354,5 | 3,7 | 61,5 |
| Source 15S | 136,0 | 0,2 | 680,0 | 7,0 | 3,5 |

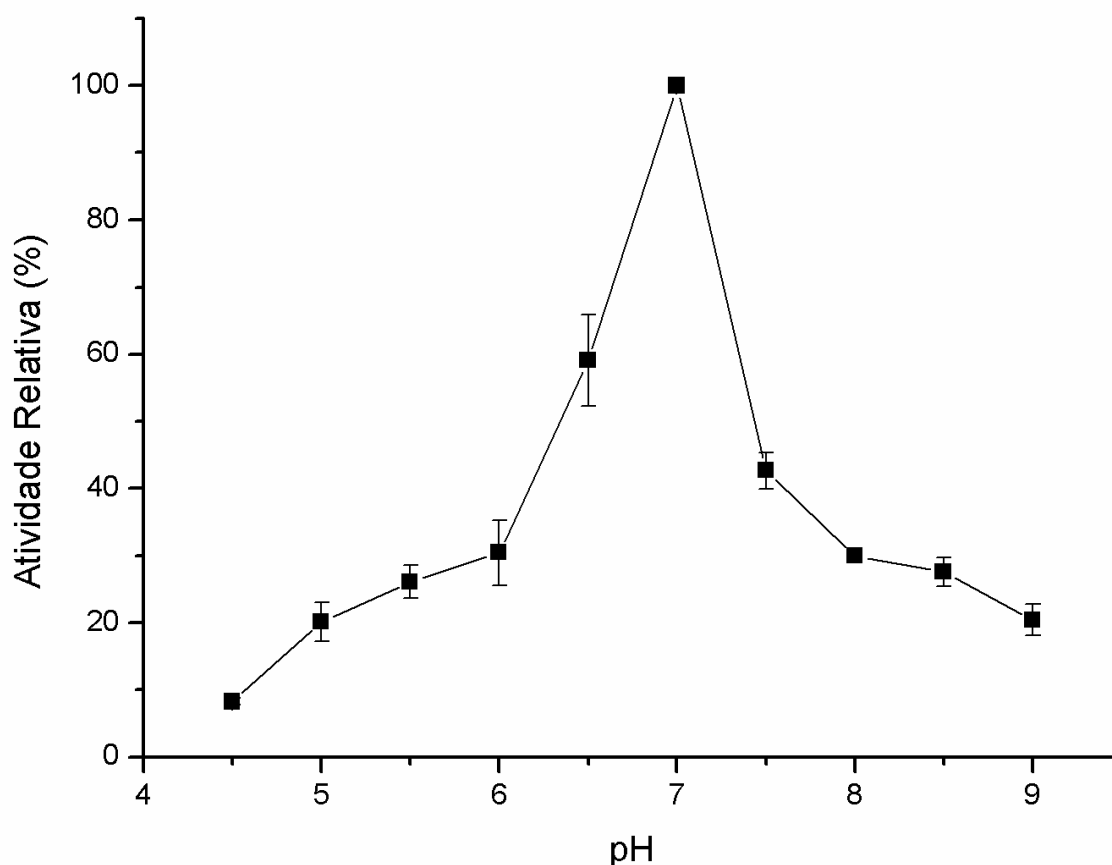
Figura 30. SDS-PAGE 12%. Peptidase secretada pelo fungo *Leptosphaeria* sp. Marcador de massa molecular (1) e peptidase pura (2). As bandas do marcador de baixa massa molecular (GE Healthcare) são: Fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa).



5.3.2 Efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

Conforme é mostrado na **Figura 31**, a máxima atividade proteolítica da peptidase secretada pelo fungo *Leptosphaeria* sp. foi alcançada em pH 7. Esta enzima mostrou restrição de atividade com ligeiras variações em pH, sendo descrito atividade remanescente de 60% em pH 6 e 40% em pH 7,5.

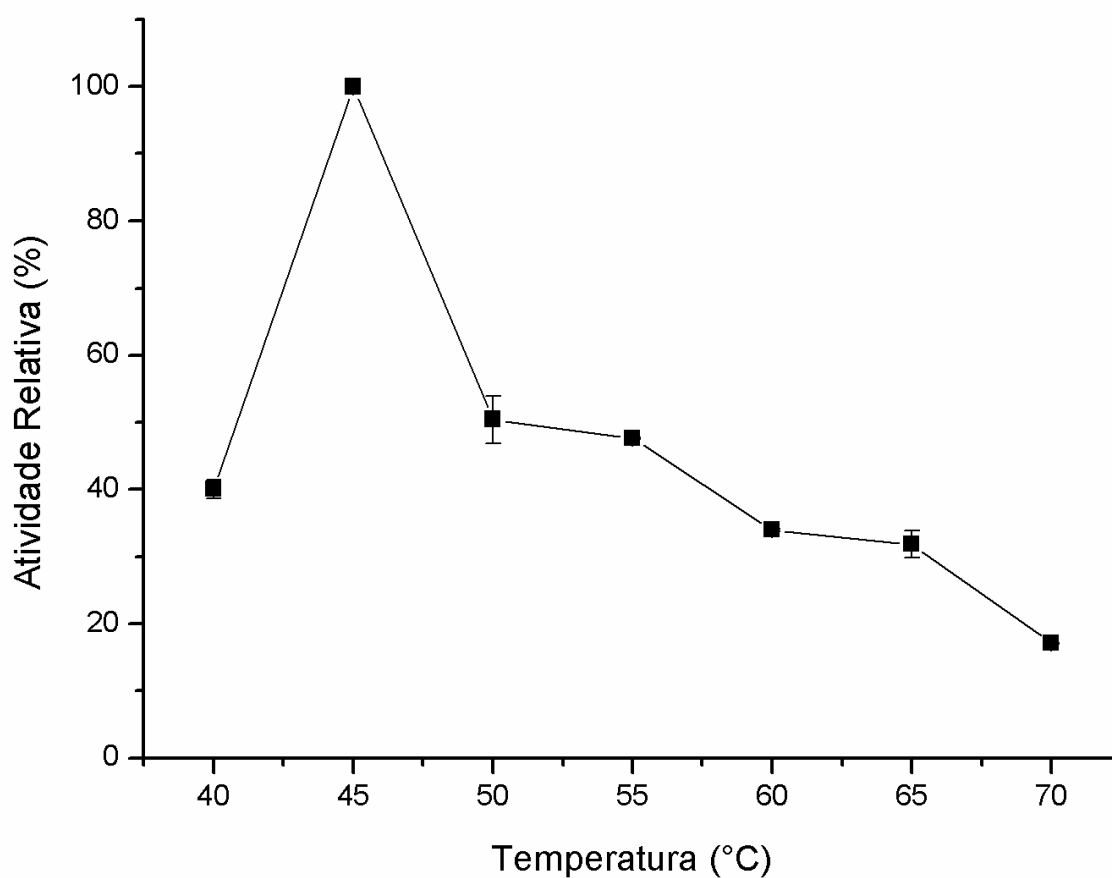
Figura 31. Efeito de pH na atividade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: temperatura de 45 °C; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



Por efeito de temperatura na catálise, podemos observar máxima atividade proteolítica a 45 °C, e perda progressiva da hidrólise enzimática conforme ocorre

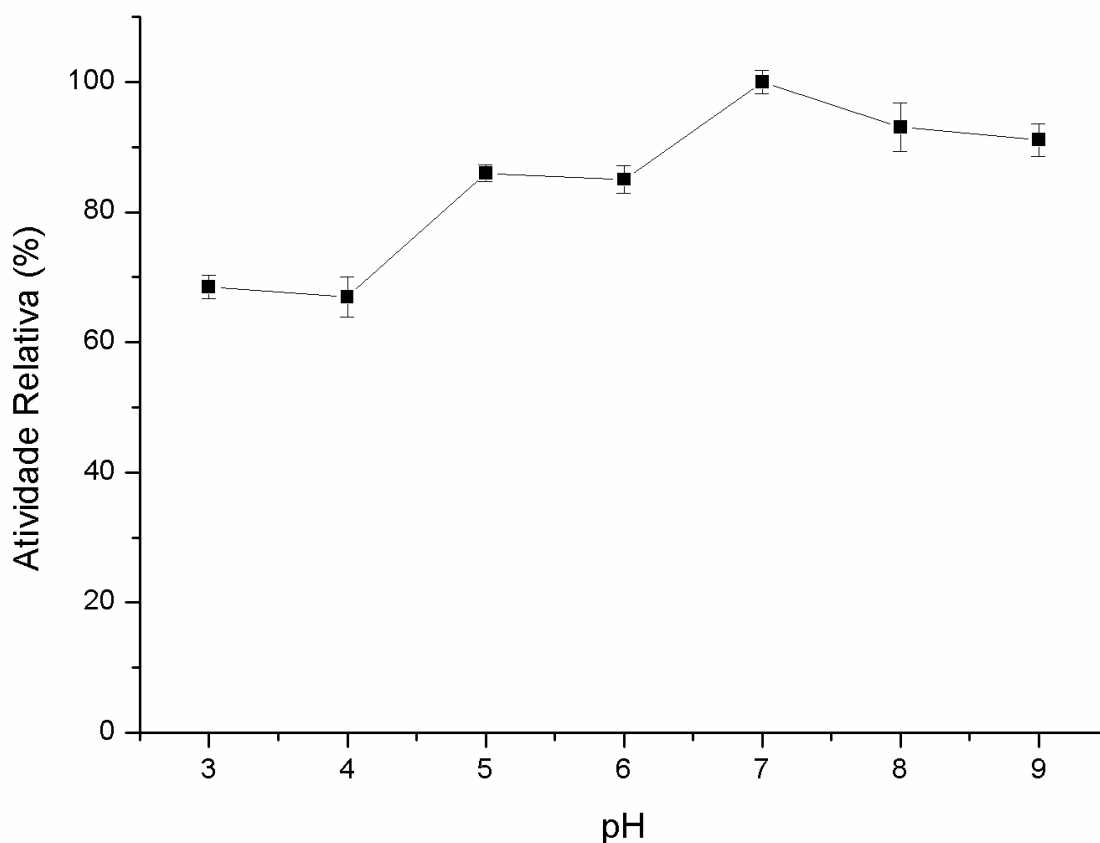
aumento da temperatura, sendo notado 50% de atividade remanescente a 50 °C (Figura 32).

Figura 32. Efeito de temperatura na atividade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



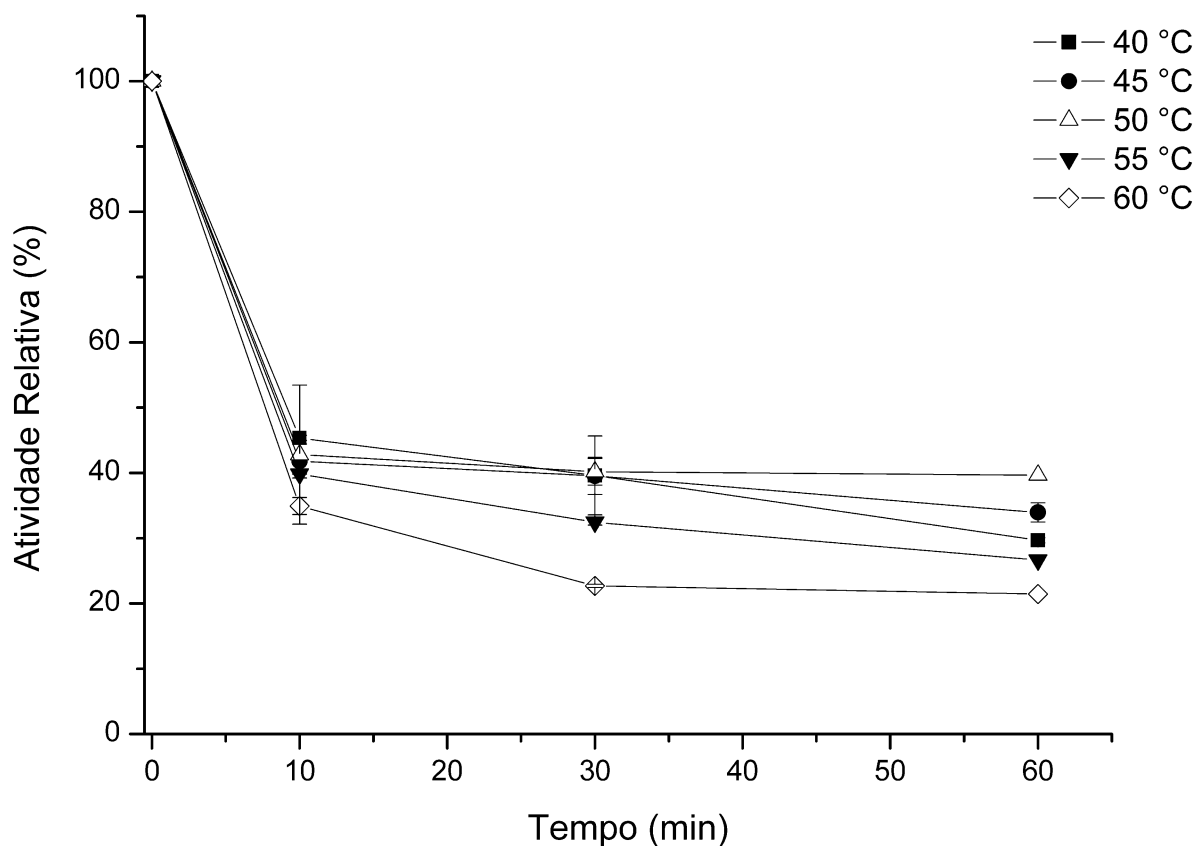
Com incubação da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. a diferentes pH (por 1 hora a 25 °C), observamos maior estabilidade com tendência a condições alcalinas e menor tolerância à pH ácido (3 e 4). Em destaque, observamos maior estabilidade na faixa de pH 5-9, sendo reportado atividade relativa acima de 80%. (Figura 33).

Figura 33. Efeito de pH na estabilidade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, na faixa de pH 3-9, por 1 hora a 25 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



Em estabilidade térmica, é interpretado um efeito similar da temperatura na faixa de 40-50 °C, cuja peptidase demonstrou cerca de 40% de atividade residual por 10 min de incubação e posterior diminuição no desempenho da enzima de acordo com o aumento progressivo da temperatura de exposição (**Figura 34**).

Figura 34. Efeito de temperatura na estabilidade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. A enzima foi incubada, na ausência de substrato, por 10, 30 e 60 minutos na faixa de temperatura de 40-60 °C. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



5.3.3 Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

Em estudo com inibidores de peptidases, o modo de ação desta enzima secretada por *Leptosphaeria* sp. foi determinado como mostra a **tabela 8**. É notório a redução da atividade causada por EDTA (atividade residual de 60%) e a intensa inibição promovida por PMSF (atividade remanescente de 23%), ambos a 5 mM. Estes resultados sugerem que a enzima purificada é uma serino peptidase e

apontam a importância de íons metálicos na atividade da peptidase, cuja presença do agente quelante EDTA acarretou considerável redução da performance catalítica.

Tabela 8. Efeito de inibidores na atividade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

| Inibidores (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|-------------------|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 4,0 |
| AIA | 85,0 ± 2,0 |
| EDTA | 60,0 ± 8,0 |
| PMSF | 23,0 ± 0,2 |

Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

O efeito de íons metálicos sobre a atividade da serino peptidase revelou aumento e diminuição da catálise de acordo com sais avaliados. A **tabela 9** mostra o efeito modulador positivo de 10 a 20% na atividade proteolítica em presença de íons cloretos: sódio (21%), lítio (18%), magnésio (15%), potássio e cálcio (12%), manganês (10%) e bário (7%). Por outro lado, outros íons metálicos apresentaram efeito de modulação negativa na atividade enzimática, tais como: cloreto de alumínio e cobalto, e especialmente, cloreto de cobre II, cuja atividade proteolítica foi reduzida a 3,5% de sua atividade inicial.

Tabela 9. Efeito de íons metálicos na atividade da serino peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

| Íons metálicos (5 mM) | Atividade Relativa (%) |
|--|------------------------|
| Controle | 100,0 ± 0,2 |
| Cloreto de sódio (NaCl) | 121,0 ± 6,0 |
| Cloreto de lítio (LiCl) | 118,0 ± 8,0 |
| Cloreto de magnésio (MgCl ₂) | 115,0 ± 2,0 |
| Cloreto de potássio (KCl) | 112,0 ± 3,0 |
| Cloreto de cálcio (CaCl ₂) | 112,0 ± 1,0 |
| Cloreto de manganês (MnCl ₂) | 110,0 ± 1,0 |
| Cloreto de bário (BaCl ₂) | 107,0 ± 3,5 |
| Cloreto de alumínio (AlCl ₃) | 86,0 ± 5,5 |
| Cloreto de cobalto (CoCl ₂) | 55,0 ± 1,0 |
| Cloreto de cobre II (CuCl ₂) | 3,5 ± 0,5 |

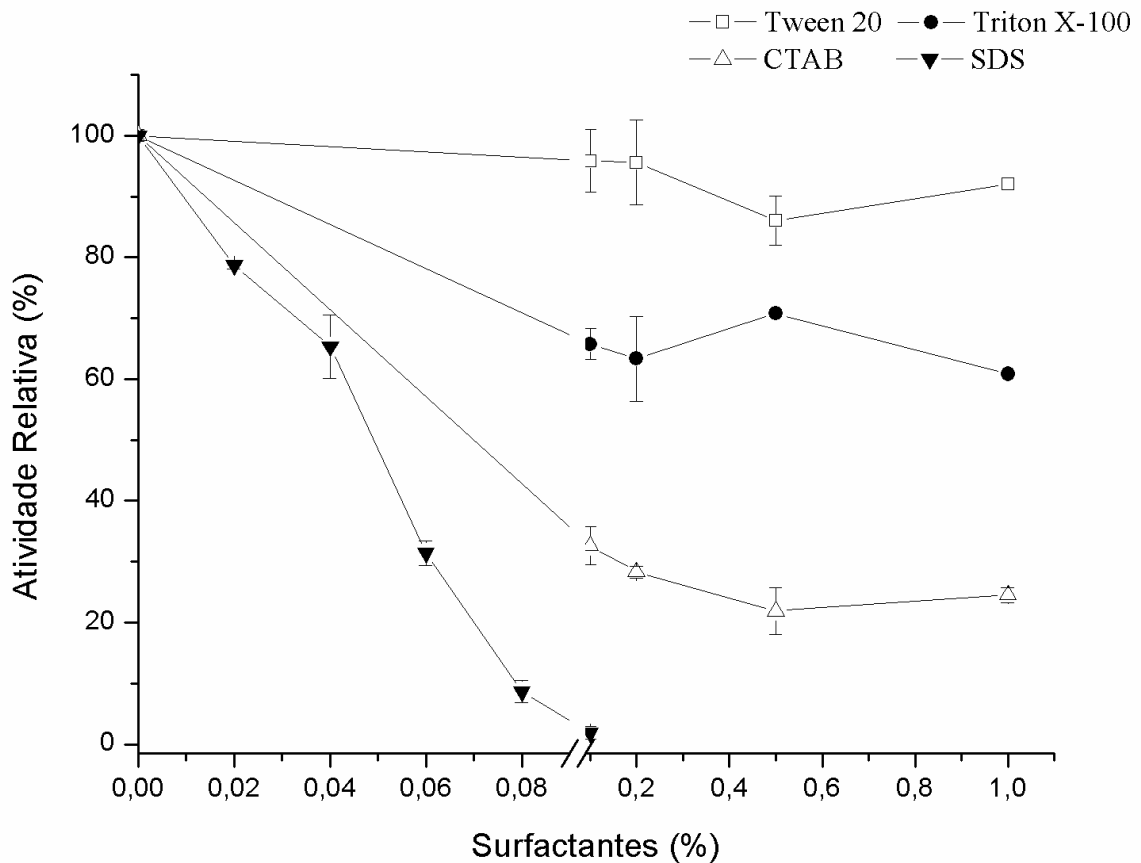
Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

5.3.4 Efeito de surfactantes, ureia, DTT e guanidina na atividade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

O efeito de surfactantes na atividade da serino peptidase revelou maior efetividade de tensoativos iônicos na diminuição da performance enzimática. Em presença de CTAB, notamos atividade residual de 32% e, perda total da atividade enzimática em incubação com SDS, ambos na concentração final de 0,1% (**Figura 35**).

Sob o efeito de surfactantes não iônicos, observamos menor influência na redução na atividade enzimática. A serino peptidase apresentou 90% e 60% de atividade residual em presença de Tween 20 e Triton X-100, respectivamente, à concentração final de 1% na mistura de reação (**Figura 35**).

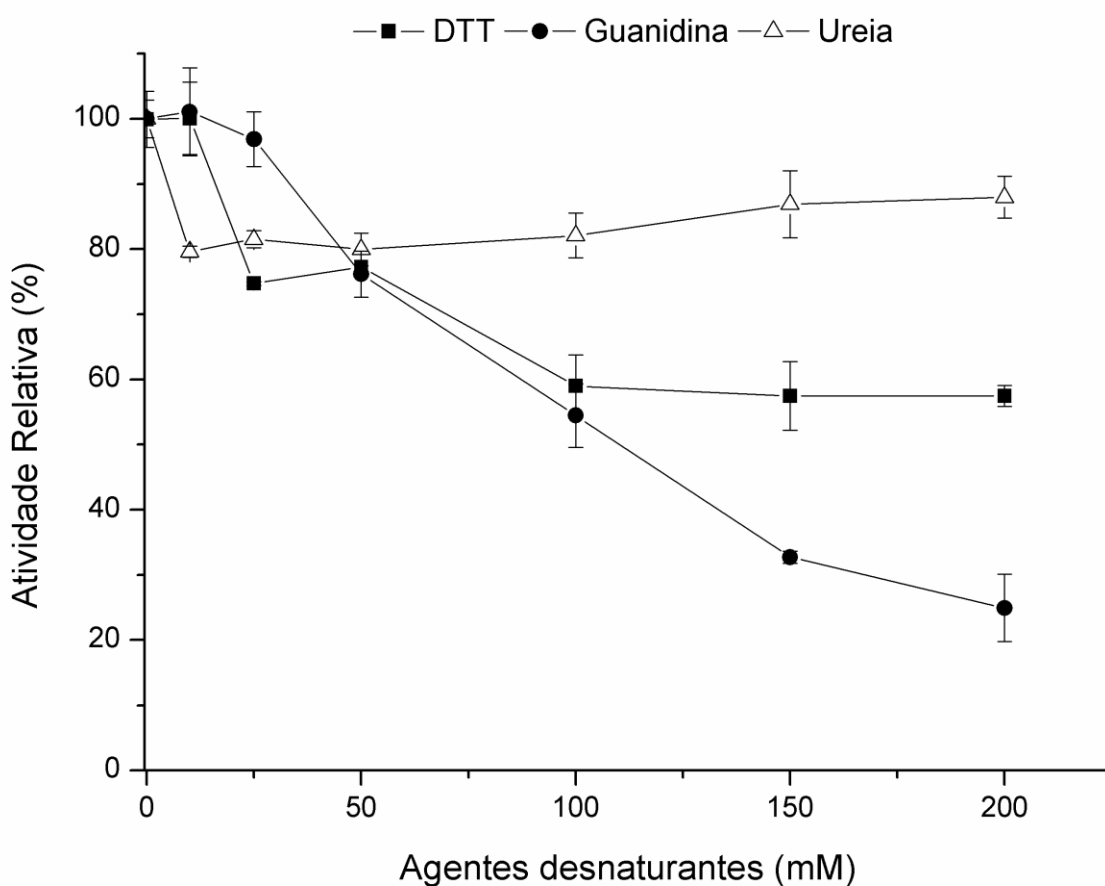
Figura 35. Efeito de surfactantes na atividade da serino peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



Para serino peptidase, como mostrado na **Figura 36**, notamos uma modulação negativa promovida por guanidina e DTT, e menor efeito de ureia na atividade proteolítica. Em incubação com ureia, em diferentes concentrações, a peptidase manteve atividade relativa praticamente constante a 80% de sua atividade inicial. Contudo, em presença de DTT e guanidina, observamos decréscimo da atividade enzimática em função do aumento da concentração destes agentes desnaturantes.

Em incubação com DTT e guanidina, a peptidase manteve aproximadamente 60% de sua atividade enzimática a 100 mM de ambos estes agentes químicos e atividade relativa de 57% (DTT) e 25% (guanidina) a concentração de 200 mM.

Figura 36. Efeito de DTT, guanidina e ureia sobre a atividade da serino peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp. Os símbolos representam a média das triplicatas e as barras verticais o desvio padrão. Condições de reação: tampão HEPES (0,1 M), pH 7, a 45 °C; 0,1 mM de enzima e 1 µM de substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.



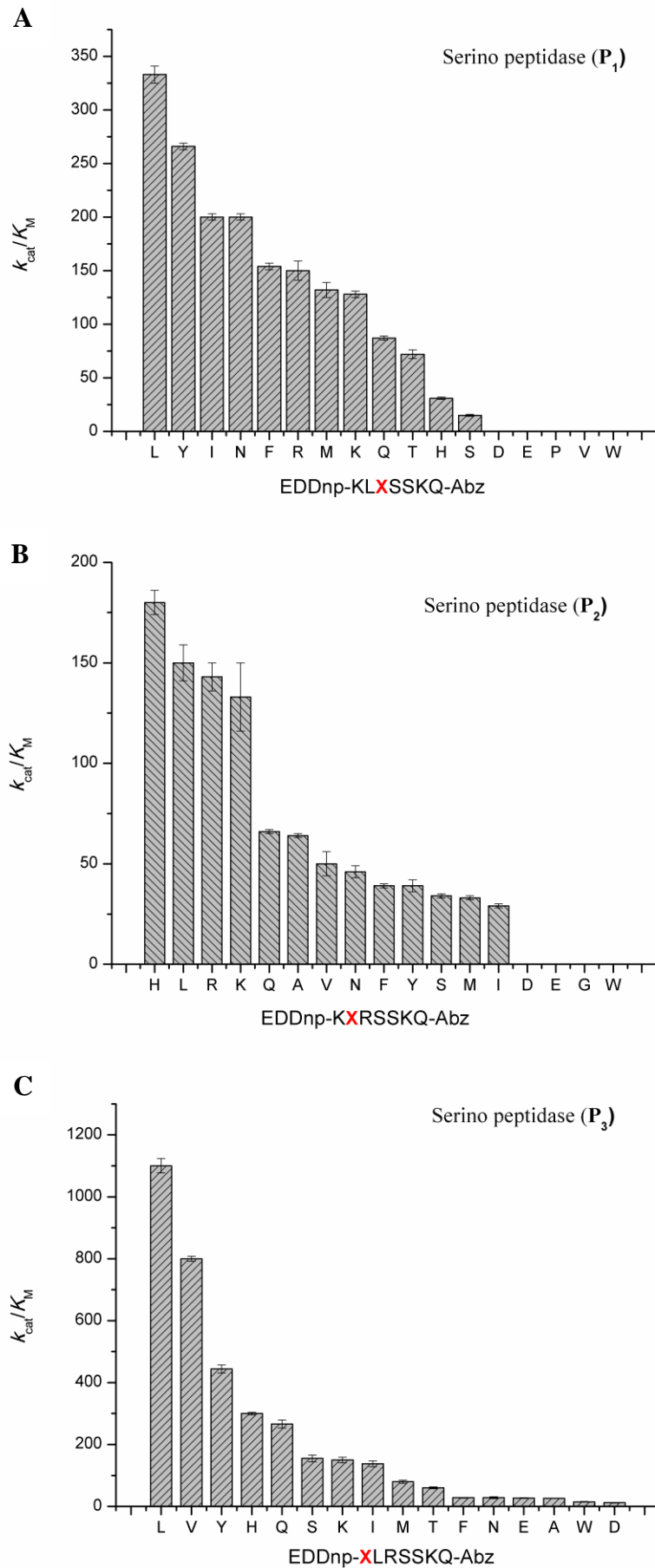
5.3.5 Estudo de especificidade da peptidase secretada por *Leptosphaeria* sp.

Em serino peptidase, estudos de especificidade demonstraram alta preferência por aminoácidos apolares, especialmente leucina e isoleucina, hidrólise moderada para aminoácidos polares básicos e neutros quando avaliados nas diferentes posições dos substratos. Além disso, a peptidase demonstrou baixa catálise com

aminoácidos ácidos (D e E) e W (aromático apolar), tendo sido visualizada reduzida ou nenhuma hidrólise em substratos com estes aminoácidos.

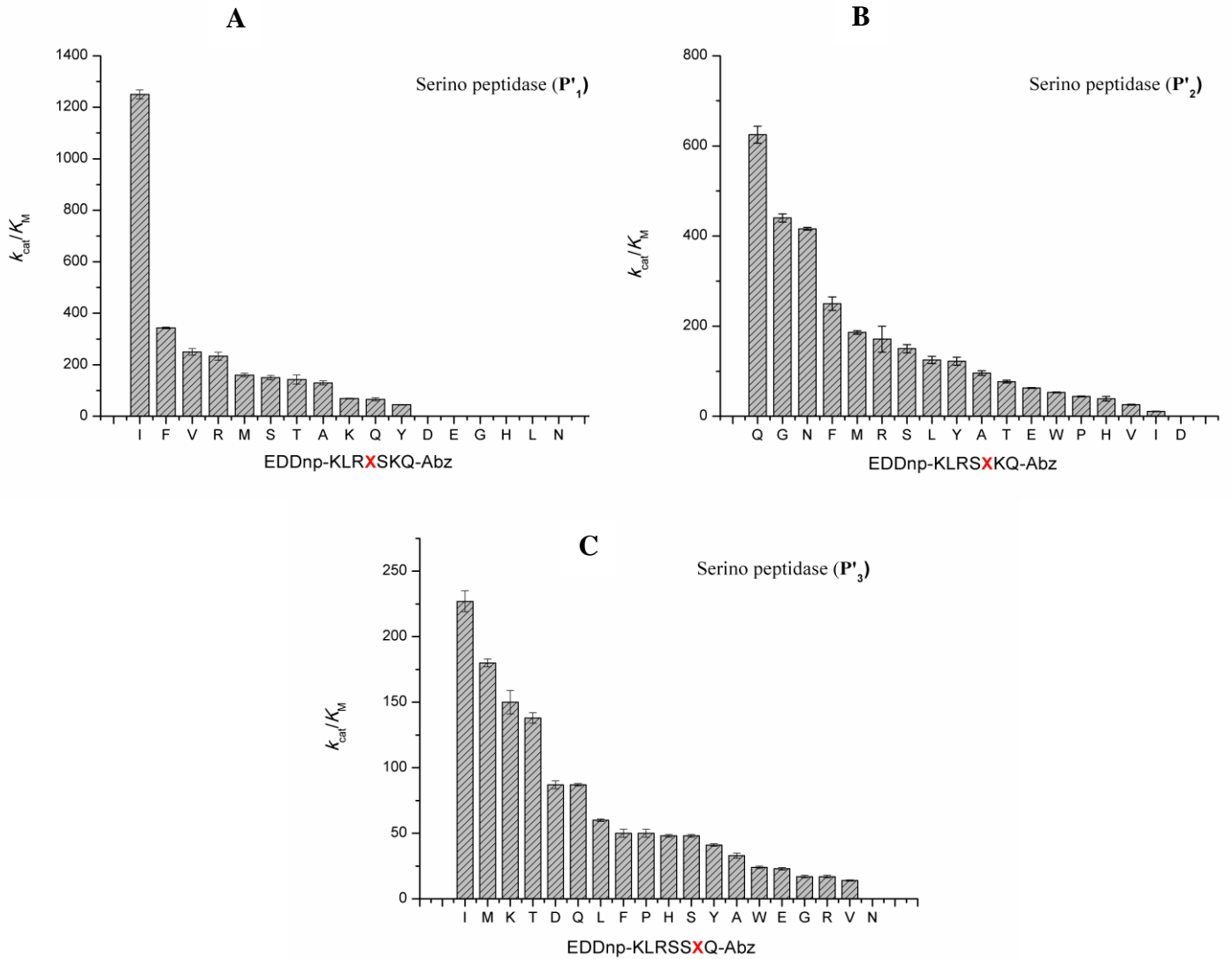
Em P₁ (**Figura 37 A**) destaca-se: aminoácidos apolares, leucina (333,5 mM⁻¹s⁻¹), isoleucina (200 mM⁻¹s⁻¹), fenilalanina (154 mM⁻¹s⁻¹) e metionina (132,5 mM⁻¹s⁻¹); aminoácidos básicos, arginina (150 mM⁻¹s⁻¹) e lisina (128,5 mM⁻¹s⁻¹) e polar neutro, tirosina (266,5 mM⁻¹s⁻¹) e asparagina (200 mM⁻¹s⁻¹). Na posição P₂ (**Figura 37 B**): aminoácidos básicos, histidina (180 mM⁻¹s⁻¹), arginina (143 mM⁻¹s⁻¹) e lisina (133,5 mM⁻¹s⁻¹) e, apolar leucina (150 mM⁻¹s⁻¹). P₃: aminoácidos apolares, leucina (1.100 mM⁻¹s⁻¹) e valina (800 mM⁻¹s⁻¹), básico, histidina (300 mM⁻¹s⁻¹) e polar neutro, tirosina (444,5 mM⁻¹s⁻¹) e glutamina (266,5 mM⁻¹s⁻¹) (**Figura 37 C**). O Apêndice 5 (**A5**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P₁, P₂ e P₃.

Figura 37. Especificidade da serino peptidase avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptideo FRET. Variação de aminoácidos nas posições “X”, P₁ (A), P₂ (B) e P₃ (C).



Substituições nas posições P' (P'₁, P'₂ e P'₃) demonstraram preferência na hidrólise dos substratos quando aminoácidos apolares, seguido por aminoácidos polares básicos e neutros estiveram presentes. Em P'₁ (**Figura 38 A**), destaca-se: isoleucina (1.250 mM⁻¹s⁻¹), fenilalanina (384,5 mM⁻¹s⁻¹), valina (250 mM⁻¹s⁻¹) e arginina (233,5 mM⁻¹s⁻¹). Posição P'₂ (**Figura 38 B**), glutamina (625 mM⁻¹s⁻¹), glicina (440 mM⁻¹s⁻¹), asparagina (416,5 mM⁻¹s⁻¹), fenilalanina (250 mM⁻¹s⁻¹), metionina (186 mM⁻¹s⁻¹) e arginina (171,5 mM⁻¹s⁻¹). E por ultimo, em P'₃, isoleucina (227 mM⁻¹s⁻¹), metionina (180 mM⁻¹s⁻¹), lisina (150 mM⁻¹s⁻¹) e treonina (138,5 mM⁻¹s⁻¹) (**Figura 38 C**). O Apêndice 6 (**A6**) detalha os parâmetros cinéticos obtidos para estes substratos nas posições P'₁, P'₂ e P'₃.

Figura 38. Especificidade da serino peptidase avaliada pela eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) obtida da hidrólise da série de peptídeo FRET. Variação de aminoácidos nas posições “X”, P₁ (A), P₂ (B) e P₃ (C).



6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, relatamos a purificação de peptidases utilizando rápida e fácil metodologia cromatográfica. Além disso, percebemos um interessante rendimento obtido no processo de concentração do extrato bruto, especialmente para aspártico e serino peptidase, cuja viabilidade é mais considerável do que o fracionamento (precipitação) utilizando solvente orgânico ou gradiente salino, como descrito por outros pesquisadores em peptidases fúngicas (HAJJI et al., 2007; MERHEB et al., 2009).

No resumo das cromatografias, notamos maior rendimento na purificação da cisteíno peptidase, como demonstrado no rendimento final de 11% sendo superior a 3,8% para serino peptidase e 2,7% para recuperação da peptidase aspártica pura.

No geral, destaca-se que as etapas cromatográficas mostradas em nosso estudo podem ser consideradas viáveis para purificação destas enzimas, tendo sido utilizados cromatografias clássicas (exclusão molecular e troca iônica) e apresentando alta homogeneidade na pureza e rendimento final superior ao descrito em outros estudos com peptidases fúngicas. Merheb et al., (2009) mostraram rendimento final de 0,4% na obtenção da metalo peptidase pura de *Thermoascus aurantiacus* e Da Silva et al., (2014) mostraram rendimento de 0,5% para serino peptidase de *Aspergillus fumigatus*.

Neste trabalho, reportamos a purificação de uma peptidase aspártica pelo fungo *R. miehei*, cuja massa molecular está de acordo com o que é exposto em outros estudos (YEGIN et al., 2011).

Desde muito tempo, *R. miehei* é reportado como uma importante fonte produtora de peptidase aspártica. Enzimas proteolíticas ácidas são alvos de estudos para aplicação na síntese de peptídeos, descoloração da carne de peixe

(Katsuobushi) e degradação de turbidez da proteína em sucos e bebidas alcoólicas (YEGIN et al., 2011; AOKI et al., 2013). Entretanto, ressalta-se como maior abordagem o uso destas enzimas para coagulação de leite na fabricação de queijo, sendo requerida como principal característica a alta especificidade catalítica para clivagem de ligação peptídica entre resíduos de Phe₁₀₅-Met₁₀₆ de *k*-caseína.

Ressaltamos também, a produção e purificação de uma cisteíno peptidase extracelular pelo fungo *P. chrysosporium*. Em geral, há poucos relatos sobre a secreção de cisteíno peptidase, isso se deve a alta tendência de oxidação do grupo tiol do resíduo de cisteína presente no sítio ativo destas enzimas, cuja oxidação compromete a catálise enzimática da peptidase (GRZONKA et al., 2001). A massa molecular desta peptidase é semelhante ao relatado em outro estudo sobre peptidase de *P. chrysosporium* (DASS et al., 1995). Outros pesquisadores também reportaram a secreção de diferentes subclasses de peptidases por este fungo, tais como aspártico e cisteíno peptidase (DATTA, 1991) e, serino peptidase (DASS et al., 1995).

Para o fungo *Leptosphaeria* sp., nós descrevemos a purificação de uma serino peptidase com massa molecular (cerca de 35 kDa) semelhante a outras serino peptidases de diferentes espécies fúngicas, tais como *Penicillium waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013), *Aspergillus fumigatus* (Da SILVA et al., 2014) e *Aspergillus clavatus* (HAJJI et al., 2007).

Na caracterização bioquímica funcional destas peptidases, consideramos a determinação dos parâmetros reacionais como informação crucial para a excelente funcionalidade das enzimas na hidrólise dos substratos, tais como efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade, efeito de íons metálicos, inibidores, agentes desnaturantes e estudo da especificidade.

Em nosso estudo, destacamos a produção e purificação de uma peptidase ácida. Na caracterização bioquímica funcional desta enzima, observamos maior atividade e estabilidade em pH ácido. Esta peptidase aspártica mostrou-se mais termoestável que a rhizopuspepsina produzida por *Rhizopus oryzae* (HSIAO et al., 2014).

Para cisteíno peptidase, notamos máxima atividade em pH 7 e temperatura na faixa de 45-55 °C. Esta enzima apresentou atividade ótima em temperatura superior a outras peptidases fúngicas (Da SILVA et al., 2014; GRAMINHO et al., 2013). Além disso, é possível observar estabilidade em condições ácidas e alcalinas e temperatura até 50 °C por 1 hora, mantendo 90% de sua atividade original.

No que se refere à atividade e estabilidade da serino peptidase, observamos características bioquímicas de peptidase neutra, maior estabilidade em condições alcalinas e baixa estabilidade térmica, mesmo em curto tempo de exposição. A produção de serino peptidases neutro/alcalina também foi reportada por outros pesquisadores. (SILVA; ANGELO; CABRAL, 2013; SILVA et al., 2013; Da SILVA et al., 2014).

Comparativamente, é possível destacar maior estabilidade exibida pela peptidase aspártica em pH ácido, enquanto que serino peptidase demonstrou melhor tolerância em condições alcalinas, e cisteíno peptidase em ampla faixa de pH. Nota-se menor tolerância sob efeito de pH e temperatura, na atividade e estabilidade, de serino peptidase, cuja ligeiras variações nas unidades destes fatores físico-químicos promoveu intensa redução da atividade enzimática. Diferentemente, a cisteíno peptidase mostrou-se mais tolerante sob efeito de temperatura e pH, exibindo maior estabilidade em ampla faixa de pH (ácido e alcalino) e maior termoestabilidade dentre as três enzimas descritas neste trabalho.

A tolerância a diferentes faixas de pH e temperatura são características importantes exigidas à enzimas para aplicação em diversos setores industriais, sendo requeridas para as condições de atividade enzimática, resistência às condições químicas do meio e estabilidade térmica em processos industriais.

É bem divulgado que íons metálicos podem interagir com regiões proteicas. Estas interações iônicas podem modificar o arranjo molecular e conseqüente interferência na catálise, promovendo modulação positiva ou negativa na atividade da enzima. Além disso, o sítio ativo de peptidases apresentam grupos funcionais quimicamente reativos, e a interação química com íons possivelmente promove diminuição ou perda total da atividade proteolítica. Para este efeito é justificada a modulação negativa provocada por diversos íons metálicos nas três peptidases destacadas neste trabalho, em especial ao íon cobre II, tendo sido notado intensa redução da atividade de aspártica, cisteíno e serino peptidases.

Outros pesquisadores também demonstraram a modulação negativa na atividade proteolítica de diferentes peptidases fúngicas por efeito do cloreto de alumínio (GRAMINHO et al., 2013; Da SILVA et al., 2014) e íons cobre II (MERHEB et al., 2009).

Para serino peptidase, em referência ao estudo sobre o efeito de íons metálicos, nós observamos modulação positiva promovida por alguns íons e, por isso, sua importância na atividade desta enzima. Esta informação é reforçada pelo resultado da enzima incubada com EDTA, haja vista a presença deste agente quelante na mistura de reação ter promovido diminuição da atividade enzimática, corroborando a importância de íons no desempenho catalítico desta enzima.

Salienta-se também a modulação negativa promovida por cloreto de alumínio, cloreto de cobalto e principalmente por cloreto de cobre II. Outros estudos em serino

peptidases fúngicas relataram modulação positiva e negativa por íons metálicos. Da Silva et al., (2014) reportaram ligeiro aumento da atividade proteolítica na presença de íon potássio e diminuição causada por íon alumínio. Hajji et al., (2007) descreveram a modulação positiva promovida por íons magnésio e cálcio e, modulação negativa por íons cobre II e cobalto. Cálcio, bário, potássio e magnésio também estão relacionados à melhora do desempenho catalítico da serino peptidase secretada por *P. waksmanii* (GRAMINHO et al., 2013).

No estudo de estabilidade usando agentes desnaturantes como surfactantes, DTT, ureia e guanidina, observamos uma grande influência sobre a atividade proteolítica destas enzimas. Influência negativa de tensoativos na reação enzimática é justificada pelo efeito de interferência nas interações hidrofóbicas; DTT é um agente redutor e capaz de promover redução em ligações dissulfetos (S-S) entre dois resíduos de cisteína na cadeia polipeptídica; ureia e guanidina são agentes caotrópicos, e a presença no meio reacional promove rompimento de ligações de hidrogênio na proteína (enzima).

Todos esses agentes químicos e seus peculiares efeitos na cadeia do polipeptídeo promovem interferências em importantes forças intra-moleculares necessárias para manutenção do arranjo molecular. Desta forma, a ação destes compostos é capaz de causar modificação na estrutura da proteína (desnaturação) e consequente redução ou perda de atividade proteolítica.

O efeito destes agentes químicos em incubação com as enzimas fornece algumas importantes informações sobre as forças moleculares no enovelamento da proteína. Em nosso estudo, em presença de surfactantes (especialmente SDS e CTAB), guanidina e DTT em diferentes concentrações, notamos intensa redução na atividade enzimática das três enzimas. Estes resultados sugerem a intensa

influência de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ponte dissulfeto no arranjo molecular destas proteínas.

Neste estudo, observamos a sensibilidade das peptidases em presença de surfactantes, principalmente os tensoativos iônicos, sugerindo a eficácia de um núcleo (*core*) hidrofóbico na arquitetura destas enzimas. Resultados semelhantes descrevendo a desnaturação causada por surfactantes e DTT em peptidases fúngicas também foram reportados por outros pesquisadores (GRAMINHO et al., 2013; SILVA et al., 2013; MERHEB et al., 2009;. HAJJI et al., 2007).

Além disso, não foi observada grande interferência de ureia sobre a atividade proteolítica nas distintas concentrações ensaiadas para aspartil, cisteíno e serino peptidases. De forma divergente, guanidina foi mais efetiva no rompimento de ligações de hidrogênio e consequente redução da atividade enzimática. Sugere-se que a diferença de cargas entre ureia (agente caotrópico de carga neutra) e guanidina (agente caotrópico catiônico) é responsável pelo efeito distinto entre estes agentes químicos na desnaturação das três peptidases.

Notavelmente, a cisteíno peptidase secretada pelo fungo *P. chrysosporium* não apresentou melhora da atividade enzimática quando incubada em baixa concentração do agente redutor DTT, diferentemente do que é descrito em estudos com outras cisteíno peptidases.

A papaína, importante cisteíno peptidase utilizada como modelo para peptidases desta subclasse, geralmente apresenta ativação em presença de agente redutor na mistura de reação, devido à elevada tendência de oxidação do grupo tiol presente no sítio ativo. O desempenho catalítico é dependente de ataque nucleofílico promovido pelo resíduo de cisteína, e a presença de agente redutor

mantém este resíduo funcional na forma reduzida e competente ao ataque nucleofílico sobre o substrato (GRZONKA et al., 2001).

Em estudos de especificidade, destaca-se que, apesar da generalidade na hidrólise dos substratos, a peptidase aspártica descreveu grande aceitação na catálise com substratos contendo aminoácidos apolares, especialmente metionina, aminoácidos básicos (H, K e R), resíduos aromáticos (F, W e Y) e polares neutros (N e T em P₂). Nós também notamos baixa preferência na hidrólise de substratos contendo aminoácidos ácidos (D e E).

As propriedades catalíticas da peptidase aspártica descrita neste trabalho estão em conformidade com algumas características de preferência por aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos), especialmente fenilalanina, assim como é descrito por outros pesquisadores em estudo com peptidase aspártica humana (BRINKWORTH et al., 2001) e fúngica (RAO et al., 2011).

São poucos os estudos que relacionam a purificação e investigação das propriedades bioquímicas e catalíticas de cisteíno peptidase extracelular fúngica. Para nosso conhecimento, este é um trabalho importante que detalha as características bioquímicas de uma cisteíno peptidase altamente específica para aminoácidos básicos avaliados na posição P₃ e lisino-dependência para a ancoragem da enzima em P'₃.

Diferentemente do que é descrito por Turk et al., (1998) em estudo sobre a catálise de papaína, a cisteíno peptidase produzidas por *P. chrysosporium* mostrou elevada seletividade em P₃ e P'₃, cuja substituição de aminoácidos nestas posições revelaram alta preferência catalítica a resíduos básicos (H, K e R) em P₃ e resíduo de lisina em P'₃.

A tripsina é um exemplo importante de peptidase em que também é detalhada uma especificidade elevada por aminoácidos básicos (K e R), onde é demonstrada a clivagem da ligação peptídica ao lado C-terminal destes resíduos básicos. Esta especificidade é devido à alta seletividade no subsítio S_1 da tripsina, cuja posição no sítio ativo é ocupada pelo aminoácido ácido aspártico, um componente de tríade catalítica das serino peptidases e, responsável pela afinidade química com aminoácidos básicos arginina e lisina nesta enzima.

Em serino peptidase a preferência por aminoácidos apolares é mais evidenciada, visto que a enzima apresentou os maiores valores de eficiência catalítica quando estes aminoácidos foram substituídos em várias posições no substrato peptídico, definindo assim, a importância de resíduos apolares na catálise por esta peptidase.

É importante notar que o melhor desempenho catalítico desta peptidase é alcançado quando os aminoácidos leucina e valina são posicionados em P_3 , isoleucina em P'_1 e alta catálise com glicina em P'_2 , demonstrando a relevância na aceitação de aminoácidos hidrofóbicos por esta enzima. Estes resultados sugerem que a hidrólise da ligação peptídica na proteína ou peptídeo é favorecida pelo ancoramento da enzima em sequências peptídicas apolares do substrato. Outros estudos com serino peptidases fúngicas também relataram resultados semelhantes descrevendo preferência por aminoácidos apolares, cuja performance catalítica foi superior a resíduos ácidos, básicos e polares neutro (WATSON et al., 2011; GRAMINHO et al., 2013; Da SILVA et al., 2014).

Um sumário das características bioquímicas das três enzimas é exposto no Apêndice 7 (**A7**).

7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo, relatamos a purificação de aspártico, cisteíno e serino peptidases com facilitados métodos de purificação e rendimentos finais valorizados dentre os relatos na literatura com peptidases fúngicas.

Comparativamente, verificamos propriedades bioquímicas diferentes para cada peptidase, sob influência dos variados agentes fisico-químicos estudados. Em resumo das características das enzimas, destacamos a purificação de uma peptidase ácida e outras duas peptidases neutra/alcalinas. Também foi descrito a modulação negativa promovida, em especial, por DTT, guanidina, surfactantes iônicos e íon cobre II na performance catalítica das três enzimas.

Em aspártico peptidase, destaca-se a importância do fungo *R. miehei* para aplicação industrial, cujo reconhecido uso deste fungo e as peculiaridades desta enzima realça a importância de seu uso em biotecnologia, como na síntese de peptídeos, hidrolisados de caseína e principalmente na coagulação de leite para o preparo de queijo.

Cisteíno peptidase, motivado pela sua especificidade catalítica, justifica a importância na produção, estudo do mecanismo de ação e aplicação como promissora enzima em biotecnologia, como em pesquisa básica (biologia molecular, proteômica) e industrial.

Serino peptidase, conforme o detalhamento de suas propriedades bioquímicas e generalidade em sua especificidade pode ser alvo de estudo em tratamento de resíduos protéicos e hidrolisados peptídicos.

Conclui-se, também, que as informações obtidas neste trabalho possibilita o prosseguimento de futuros estudos em expressão heteróloga, proporcionando

melhoramento na produção, recuperação em processos de purificação e avaliação dos citados potenciais de aplicação destas enzimas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A. C. V.; ROGANA, E., BARBOSA, C. F.; FERREIRA-ALVES, D. L. The correction of reaction rates in continuous fluorometric assays of enzymes. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 471-479, 2007.

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p.175-183, 1997.

AOKI, K.; MATSUBARA, S.; UMEDA, M.; TACHIBANAC, S.; DOI, M.; TAKENAKA, S. Aspartic protease from *Aspergillus* (Eurotium) repens strainMK82 is involved in the hydrolysis and decolourisation of dried bonito (Katsuoobushi). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 1349–1355, 2013.

BIANCHI, C. A Indústria Brasileira de Biotecnologia: montando o quebra-cabeça. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 9, n. 2, p. 99-116, 2013.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

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

BRINKWORTH, R. I.; PROCIV, P.; LOUKAS, A.; BRINDLEY, P. J. Hemoglobin-degrading, aspartic proteases of blood-feeding parasites: substrate specificity revealed by homology models. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 42, p. 38844-38851, 2001.

DA SILVA, R. R.; CAETANO, R. C.; OKAMOTO, D. N.; DE OLIVEIRA, L. C. G.; BERTOLIN, T. C.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; OLIVEIRA, A. H. C.; ROSA, J. C.; CABRAL, H. The Identification and Biochemical Properties of the Catalytic Specificity of a Serine Peptidase Secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius. **Protein & Peptide Letters**, v. 21, p. 663-671, 2014.

DASS, S. B.; DOSORETZ, C. G.; REDDY, A.; GRETHLEIN, H. E. Extracellular proteases produced by the wood-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* under ligninolytic and non-ligninolytic conditions. **Archives of microbiology**, v. 163, p. 254-258, 1995.

DATTA, A. Purification and Characterization of a Novel Protease from Solid Substrate Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 728-736, 1992.

DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. **Gen Publishing Inc., A Mary Ann Liebert Inc. Company**, v. 3, n. 3, p. 269-283, 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.

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

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

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; DA SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, p. 136-145, 2007.

GRAMINHO, E. R.; SILVA, R. R.; CABRAL, T. P. F.; ARANTES, E. C.; DA ROSA, N. G.; JULIANO, L.; OKAMOTO, D. N.; OLIVEIRA, L. C. G.; KONDO, M. Y.; JULIANO, M. A.; CABRAL, H. Purification, Characterization, and Specificity Determination of a New Serine Protease Secreted by *Penicillium waksmanii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 169, p. 201–214, 2013.

GRZONKA, Z.; JANKOWSKA, E.; KASPRZYKOWSKI, F.; KASPRZYKOWSKA, R.; LANKIEWICZ, L.; WICZK, W.; WIECZERZAK, E.; CIARKOWSKI, J.; DRABIK, P.; JANOWSKI, R.; KOZAK, M.; JASKÓLSKI, M.; GRUBB, A. Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 1-20, 2001.

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

HAJJI, M.; KANOUN, S.; NASRI, M.; GHARSALLAH, N. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, v. 42, p.791-797, 2007.

HAKI, G. D.; RAKSHIT, S. K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. **Bioresource Technology**, v. 89, p. 17-34, 2003.

HOLLIDAY, G. L.; MITCHELL, J. B.; THORNTON, J. M. Understanding the functional roles of amino acid residues in enzyme catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 390, p. 560–577, 2009.

HSIAO, N-W.; CHEN, Y.; KUAN, Y-C.; LEE, Y-C.; LEE, S-K.; CHAN, H-H.; KAO, C-H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89–94, 2014.

KASANA, R. C.; SALWAN, R.; YADAV, S. K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, p. 262–276, 2011.

KATAOKA, Y.; TAKADA, K.; OYAMA, H.; TSUNEMI, M.; JAMES, M. N. G.; ODA, K. Catalytic residues and substrate specificity of scytalidoglutamic peptidase, the first member of the eqolisin in family (G1) of peptidases. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2991–2994, 2005.

KIRK, O.; BORCHERT, T.V.; FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.345-351, 2002.

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

KUMAR, A.; GROVER, S.; SHARMA, J.; BATISH, V. K. Chymosin and other milk coagulants: sources and biotechnological interventions. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 243–258, 2010.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, 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

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: Present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155–1163, 2013.

LI, W. F.; ZHOU, X. X.; LU, P. Structural features of thermozyms. **Biotechnology Advances**, v. 23, p. 271–281, 2005.

MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O.; JULIANO, L.; ARANTES, E. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Biochemical and functional characterization of a metalloprotease from

the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9210-9217, 2009.

MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, p. 646-651, 1977.

PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; MCCARTHY, I.; DEL RIO, L. A. Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 521-530, 2002.

PAPAGIANNI, M.; Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. **Biotechnology Advances**, v. 22, p. 189–259, 2004.

PILLAI, B.; CHERNEY, M. M.; HIRAGA, K.; TAKADA, K.; ODA, K.; JAMES, M. N. G. Crystal Structure of Scytalidoglutamic Peptidase with its First Potent Inhibitor Provides Insights into Substrate Specificity and Catalysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 365, p. 343–361, 2007.

RAO, S.; MIZUTANI, O.; HIRANO, T.; MASAKI, K.; LEFUJI, H. Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, p. 441–446, 2011.

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

ROCA, M.; LIU, H.; MESSER, B.; WARSHEL, A. On the Relationship between Thermal Stability and Catalytic Power of Enzymes. **Biochemistry**, v. 46, p. 15076-15088, 2007.

RODRIGUEZ, J.; GUPTA, N.; SMITH, R. D.; PEVZNER, P. A. Does Trypsin Cut Before Proline? **Journal of Proteome Research**, v. 7, p. 300-305, 2008.

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

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, p. 25-55.

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

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

SILVA, R. R.; ANGELO, T.; CABRAL, H. Comparative Evaluation of Peptidases Produced by *Penicillium corylophilum* and *Penicillium waksmanii* in Solid State Fermentation Using Agro-industrial Residues. **Journal of Agricultural Science and Technology B**, v. 3, p. 230-237, 2013.

SILVA, R. R.; CABRAL, T. P. F.; RODRIGUES, A.; CABRAL, H. Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 235-243, 2013.

SINHA, R.; RADHA, C.; PRAKASH, J.; KAUL, P. Whey protein hydrolysate: functional properties, nutritional quality and utilization in beverage formulation. **Food Chemistry**, v. 101, n. 4, p. 1484-1491, 2007.

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

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

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbial and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, p. 211–220, 2006.

TURK, D.; GUNÈAR, G.; PODOBNIK, M.; TURK, B. Revised definition of substrate sites of papain-like cysteine proteases. **Biological Chemistry**, v. 379, p. 137–147, 1998.

TYNDALL, J. D. A.; NALL, T.; FAIRLIE, D. P. Proteases Universally Recognize Beta Strands In Their Active Sites. **Chemical Reviews**, v. 105, p. 973-999, 2005.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILLAR, C. N.; ROMERO-GÓMEZ, J. D. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 157-167, 2003

WARD, O. P.; RAO, M. B.; KULKARNI, A. Proteases, production. **Elsevier**, p. 495-511, 2009.

WATSON, D. S.; FENG, X.; ASKEW, D. S.; JAMBUNATHAN, K.; KODUKULA, K.; GALANDE, A. K. Substrate Specificity Profiling on the *Aspergillus fumigatus* Proteolytic Secretome Reveals Consensus Motifs with Predominance of Ile/Leu and Phe/Tyr. **Plos One**, v. 6, p. 1-13, 2011.

YABUKI, Y.; KUBOTA, K.; KOJIMA, M.; INOUE, H.; TAKAHASHI, K. Identification of a glutamine residue essential for catalytic activity of aspergilloglutamic peptidase by site-directed mutagenesis. **FEBS Letters**, v. 569, p. 161–164, 2004.

YEGIN, S.; FERNANDEZ-LAHOURE, M.; SALGADO, A. J. G.; GUVENC, U.; GOKSUNGUR, Y.; TARI, C. Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 949-960, 2011.

APÊNDICES

A1. Parâmetros cinéticos da hidrólise da série de peptídeo FRET em peptidase aspártica

| Substrato posição P ₁ | k_{cat} (s ⁻¹) | K_M (μM) | k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹) |
|----------------------------------|------------------------------|-------------|---|
| Abz-KLASSKQ-EDDnp | 0,07 ± 0,01 | 2,0 ± 0,25 | 35 ± 4,2 |
| Abz-KLCSSKQ-EDDnp | 0,47 ± 0,06 | 2,5 ± 0,01 | 188 ± 2,0 |
| Abz-KLFSSKQ-EDDnp | 0,32 ± 0,01 | 0,5 ± 0,02 | 640 ± 4,0 |
| Abz-KLHSSKQ-EDDnp | 0,1 ± 0,07 | 2,0 ± 0,05 | 50 ± 4,5 |
| Abz-KLKSSKQ-EDDnp | 0,16 ± 0,01 | 0,4 ± 0,02 | 400 ± 23 |
| Abz-KLLSSKQ-EDDnp | 0,067 ± 0,008 | 2,0 ± 0,02 | 33,5 ± 0,45 |
| Abz-KLMSSKQ-EDDnp | 0,038 ± 0,002 | 1,0 ± 0,02 | 38 ± 0,85 |
| Abz-KLNSSKQ-EDDnp | 0,015 ± 0,001 | 1,0 ± 0,15 | 15 ± 2,5 |
| Abz-KLPSSKQ-EDDnp | 0,1 ± 0,01 | 2,6 ± 0,15 | 38,5 ± 2,0 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,35 ± 0,002 | 0,5 ± 0,01 | 700 ± 5,0 |
| Abz-KLVSSKQ-EDDnp | 0,03 ± 0,004 | 1,0 ± 0,2 | 30 ± 2,7 |
| Substrato posição P ₂ | k_{cat} (s ⁻¹) | K_M (μM) | k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ s ⁻¹) |
| Abz-KCRSSKQ-EDDnp | 0,36 ± 0,04 | 2,5 ± 0,2 | 144 ± 16,5 |
| Abz-KDRSSKQ-EDDnp | 0,23 ± 0,02 | 3,0 ± 0,2 | 76,5 ± 9,5 |
| Abz-KERSSKQ-EDDnp | 0,3 ± 0,006 | 1,8 ± 0,3 | 166,5 ± 33 |
| Abz-KFRSSKQ-EDDnp | 0,15 ± 0,022 | 2,0 ± 0,3 | 75 ± 8,0 |
| Abz-KGRSSKQ-EDDnp | 0,25 ± 0,03 | 0,26 ± 0,03 | 961,5 ± 28 |
| Abz-KHRSSKQ-EDDnp | 0,4 ± 0,02 | 2,5 ± 0,3 | 160 ± 17 |
| Abz-KIRSSKQ-EDDnp | 0,045 ± 0,001 | 0,25 ± 0,01 | 180 ± 2,3 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,35 ± 0,002 | 0,5 ± 0,01 | 700 ± 5 |
| Abz-KMRSSKQ-EDDnp | 0,38 ± 0,04 | 0,4 ± 0,03 | 950 ± 73 |
| Abz-KNRSSKQ-EDDnp | 0,85 ± 0,05 | 0,8 ± 0,04 | 1.062,5 ± 54 |
| Abz-KPRSSKQ-EDDnp | 0,37 ± 0,001 | 3,0 ± 0,12 | 123,5 ± 5 |
| Abz-KQRSSKQ-EDDnp | 0,17 ± 0,006 | 0,7 ± 0,02 | 243 ± 24 |
| Abz-KRRSSKQ-EDDnp | 0,34 ± 0,02 | 1,0 ± 0,01 | 340 ± 3,5 |
| Abz-KTRSSKQ-EDDnp | 0,15 ± 0,001 | 0,16 ± 0,01 | 937,5 ± 63 |
| Abz-KVRSSKQ-EDDnp | 0,16 ± 0,001 | 0,6 ± 0,03 | 266,5 ± 14 |

| Substrato posição P₃ | <i>k</i>_{cat} (s⁻¹) | <i>K</i>_M (μM) | <i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_M (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|--|
| Abz- A LRSSKQ-EDDnp | 0,1 ± 0,004 | 2,3 ± 0,3 | 43,5 ± 6 |
| Abz- D LRSSKQ-EDDnp | 0,09 ± 0,004 | 5,0 ± 0,1 | 18 ± 0,5 |
| Abz- E LRSSKQ-EDDnp | 0,08 ± 0,002 | 1,1 ± 0,01 | 73 ± 0,7 |
| Abz- F LRSSKQ-EDDnp | 0,05 ± 0,004 | 1,0 ± 0,02 | 50 ± 1 |
| Abz- H LRSSKQ-EDDnp | 0,6 ± 0,002 | 7,0 ± 0,4 | 86 ± 2 |
| Abz- I LRSSKQ-EDDnp | 0,1 ± 0,002 | 0,3 ± 0,03 | 333,5 ± 43 |
| Abz- K LRSSKQ-EDDnp | 0,35 ± 0,002 | 0,5 ± 0,01 | 700 ± 5 |
| Abz- L LRSSKQ-EDDnp | 0,085 ± 0,002 | 0,4 ± 0,06 | 212,5 ± 26,5 |
| Abz- M LRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,006 | 1,0 ± 0,1 | 60 ± 5,8 |
| Abz- Q LRSSKQ-EDDnp | 0,085 ± 0,008 | 2,5 ± 0,35 | 34 ± 5,5 |
| Abz- R LRSSKQ-EDDnp | 0,28 ± 0,04 | 0,8 ± 0,08 | 350 ± 37,5 |
| Abz- S LRSSKQ-EDDnp | 0,087 ± 0,008 | 1,0 ± 0,003 | 87 ± 0,2 |
| Abz- V LRSSKQ-EDDnp | 0,05 ± 0,002 | 1,0 ± 0,15 | 50 ± 3 |
| Abz- W LRSSKQ-EDDnp | 0,032 ± 0,004 | 0,35 ± 0,003 | 91,5 ± 4 |
| Abz- Y LRSSKQ-EDDnp | 0,1 ± 0,009 | 0,5 ± 0,1 | 200 ± 7 |
| Abz- N LRSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |

Condições de hidrólise: Tampão Acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5 a 50 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.

| Substrato posição P'₃ | <i>k</i>_{cat} (s⁻¹) | <i>K</i>_M (μM) | <i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_M (mM⁻¹s⁻¹) |
|---|--|----------------------------------|--|
| Abz-KLRSSAQ-EDDnp | 0,085 ± 0,006 | 0,14 ± 0,008 | 607 ± 36 |
| Abz-KLRSSDQ-EDDnp | 0,04 ± 0,001 | 0,1 ± 0,002 | 400 ± 46 |
| Abz-KLRSSEQ-EDDnp | 0,015 ± 0,001 | 0,1 ± 0,003 | 150 ± 14 |
| Abz-KLRSSFQ-EDDnp | 0,026 ± 0,001 | 0,04 ± 0 | 650 ± 15 |
| Abz-KLRSSGQ-EDDnp | 0,065 ± 0,006 | 0,08 ± 0 | 812,5 ± 5 |
| Abz-KLRSSIQ-EDDnp | 0,05 ± 0,004 | 0,3 ± 0,01 | 166,5 ± 27 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,035 ± 0,002 | 0,5 ± 0,01 | 700 ± 5 |
| Abz-KLRSSMQ-EDDnp | 0,045 ± 0,002 | 0,045 ± 0,001 | 1.000 ± 47 |
| Abz-KLRSSPQ-EDDnp | 0,025 ± 0,002 | 1,0 ± 0,03 | 25 ± 3 |
| Abz-KLRSSQQ-EDDnp | 0,03 ± 0,001 | 0,06 ± 0,001 | 500 ± 14 |
| Abz-KLRSSRQ-EDDnp | 0,15 ± 0,02 | 0,3 ± 0,007 | 500 ± 45 |
| Abz-KLRSSSQ-EDDnp | 0,13 ± 0,001 | 0,4 ± 0,03 | 325 ± 21 |
| Abz-KLRSSVQ-EDDnp | 0,035 ± 0,002 | 0,07 ± 0,001 | 500 ± 66 |
| Abz-KLRSSWQ-EDDnp | 0,02 ± 0,001 | 0,03 ± 0,002 | 666,5 ± 43 |
| Abz-KLRSSYQ-EDDnp | 0,05 ± 0,001 | 0,15 ± 0,001 | 333,5 ± 31 |
| Abz-KLRSSLQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KLRSSSTQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |

Condições de hidrólise: Tampão Acetato de sódio (0,1 M), pH 5,5 a 50 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.

A3. Parâmetros cinéticos da hidrólise da série de peptídeo FRET em cisteína peptidase

| Substrato posição P₁ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|---|
| Abz-KLASSKQ-EDDnp | 0,86 ± 0,02 | 2,0 ± 0,04 | 430 ± 8,6 |
| Abz-KLCSSKQ-EDDnp | 3,4 ± 0,03 | 3,4 ± 0,1 | 1.000 ± 32 |
| Abz-KLFSSKQ-EDDnp | 3,2 ± 0,03 | 1,4 ± 0,1 | 2.286 ± 84 |
| Abz-KLHSSKQ-EDDnp | 1,4 ± 0,04 | 4,2 ± 0,9 | 333,5 ± 28,5 |
| Abz-KLKSSKQ-EDDnp | 2,0 ± 0,01 | 1,5 ± 0,2 | 1.333,5 ± 61 |
| Abz-KLLSSKQ-EDDnp | 0,15 ± 0,02 | 1,6 ± 0,06 | 94 ± 3,5 |
| Abz-KLMSSKQ-EDDnp | 0,86 ± 0,06 | 3,0 ± 0,1 | 286,5 ± 11 |
| Abz-KLPSSKQ-EDDnp | 1,5 ± 0,02 | 7,3 ± 0,5 | 205,5 ± 15 |
| Abz-KLQSSKQ-EDDnp | 0,28 ± 0,01 | 1,2 ± 0,1 | 233,5 ± 22 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1,0 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |
| Abz-KLSSSKQ-EDDnp | 0,29 ± 0,03 | 1,5 ± 0,4 | 193,5 ± 46 |
| Abz-KLTSSKQ-EDDnp | 1,15 ± 0,04 | 7,3 ± 1,2 | 157,5 ± 26 |
| Abz-KLVSSKQ-EDDnp | 0,38 ± 0,04 | 1,5 ± 0,3 | 253,5 ± 47 |
| Abz-KLWSSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,01 | 1,5 ± 0,3 | 133,5 ± 33 |
| Abz-KLYSSKQ-EDDnp | 0,46 ± 35 | 2,2 ± 0,3 | 209 ± 33 |
| Abz-KLNSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Substrato posição P₂ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
| Abz-KCRSSKQ-EDDnp | 3,15 ± 0,02 | 2,4 ± 0,1 | 1.312,5 ± 58 |
| Abz-KDRSSKQ-EDDnp | 4,9 ± 0,1 | 8,5 ± 0,05 | 576,5 ± 3 |
| Abz-KERSSKQ-EDDnp | 3,4 ± 0,02 | 2,8 ± 0,04 | 1.214 ± 19 |
| Abz-KFRSSKQ-EDDnp | 1,15 ± 0,02 | 2,0 ± 0,1 | 575 ± 27 |
| Abz-KGRSSKQ-EDDnp | 3,5 ± 0,03 | 2,8 ± 0,03 | 1.250 ± 13 |
| Abz-KHRSSKQ-EDDnp | 3,5 ± 0,1 | 2,4 ± 0,2 | 1.458,5 ± 101 |
| Abz-KIRSSKQ-EDDnp | 0,25 ± 0,01 | 0,25 ± 0,04 | 1.000 ± 71 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1,0 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |
| Abz-KMRSSKQ-EDDnp | 3,4 ± 0,06 | 2,8 ± 0,02 | 1.214 ± 0,9 |
| Abz-KNRSSKQ-EDDnp | 6,7 ± 0,07 | 5,0 ± 0,3 | 1.340 ± 83 |
| Abz-KPRSSKQ-EDDnp | 2,6 ± 0,03 | 1,5 ± 0,03 | 1.733,5 ± 32 |
| Abz-KQRSSKQ-EDDnp | 4,5 ± 0,1 | 2,0 ± 0,08 | 2.250 ± 76 |
| Abz-KRRSSKQ-EDDnp | 2,0 ± 0,08 | 1,0 ± 0,05 | 2.000 ± 9 |
| Abz-KSRSSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,02 | 0,2 ± 0,02 | 1.000 ± 28 |
| Abz-KTRSSKQ-EDDnp | 1,7 ± 0,03 | 1,3 ± 0,01 | 1.308 ± 14,5 |
| Abz-KVRSSKQ-EDDnp | 1,3 ± 0,04 | 1,0 ± 0,08 | 1.300 ± 9 |
| Abz-KWRSSKQ-EDDnp | 0,45 ± 0,03 | 1,0 ± 0,05 | 450 ± 16 |
| Abz-KYRSSKQ-EDDnp | 1,8 ± 0,03 | 1,3 ± 0,02 | 1.384,5 ± 24 |

| Substrato posição P₃ | <i>k</i>_{cat} (s⁻¹) | <i>K</i>_M (μM) | <i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_M (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|--|
| Abz- A LRSSKQ-EDDnp | 1,7 ± 0,02 | 5,5 ± 0,4 | 309 ± 22 |
| Abz- D LRSSKQ-EDDnp | 0,9 ± 0,06 | 3 ± 0,08 | 300 ± 8 |
| Abz- E LRSSKQ-EDDnp | 0,9 ± 0,06 | 3,5 ± 0,5 | 257 ± 17 |
| Abz- F LRSSKQ-EDDnp | 0,9 ± 0,04 | 2,5 ± 0,05 | 360 ± 8 |
| Abz- H LRSSKQ-EDDnp | 3,5 ± 0,01 | 4,5 ± 0,3 | 778 ± 58 |
| Abz- I LRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,07 | 2,8 ± 0,3 | 589,5 ± 37 |
| Abz- K LRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |
| Abz- L LRSSKQ-EDDnp | 1,2 ± 0,07 | 7,7 ± 0,6 | 156 ± 12 |
| Abz- M LRSSKQ-EDDnp | 1,0 ± 0,08 | 10 ± 0,8 | 100 ± 8,5 |
| Abz- N LRSSKQ-EDDnp | 0,5 ± 0,03 | 8,0 ± 0,8 | 62,5 ± 6 |
| Abz- Q LRSSKQ-EDDnp | 0,85 ± 0,06 | 2,7 ± 0,2 | 315 ± 23,5 |
| Abz- R LRSSKQ-EDDnp | 2,5 ± 0,04 | 1,4 ± 0,03 | 1.786 ± 47 |
| Abz- S LRSSKQ-EDDnp | 1,2 ± 0,07 | 2,3 ± 0,1 | 522 ± 26,5 |
| Abz- V LRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,03 | 11,5 ± 0,5 | 143,5 ± 7 |
| Abz- W LRSSKQ-EDDnp | 0,25 ± 0,07 | 1,3 ± 0,03 | 192,5 ± 4,5 |
| Abz- Y LRSSKQ-EDDnp | 2,0 ± 0,05 | 3,0 ± 0,07 | 666,5 ± 15 |

Condições de hidrólise: Tampão HEPES (0,1 M), pH 7,0 a 50 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

A4. Parâmetros cinéticos da hidrólise da série de peptídeo FRET em cisteína peptidase.

| Substrato posição P₁ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|---|
| Abz-KLRASKQ-EDDnp | 2,1 ± 0,07 | 1,0 ± 0,03 | 2.100 ± 45,5 |
| Abz-KLRDSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,01 | 2,3 ± 0,18 | 87 ± 5,9 |
| Abz-KLRESKQ-EDDnp | 1,14 ± 0,03 | 5,2 ± 0,7 | 219 ± 30 |
| Abz-KLRFSKQ-EDDnp | 0,65 ± 0,05 | 0,5 ± 0,02 | 1.300 ± 59 |
| Abz-KLRGSKQ-EDDnp | 0,7 ± 0,05 | 5,3 ± 0,46 | 132 ± 11 |
| Abz-KLRHSKQ-EDDnp | 3,8 ± 0,07 | 1,7 ± 0,15 | 2.235,5 ± 93 |
| Abz-KLRISKQ-EDDnp | 0,35 ± 0,02 | 0,6 ± 0,03 | 583,5 ± 30 |
| Abz-KLRMSKQ-EDDnp | 2,0 ± 0,05 | 0,65 ± 0,02 | 3.077 ± 78 |
| Abz-KLRPSKQ-EDDnp | 0,25 ± 0,05 | 4,2 ± 0,8 | 59,5 ± 11 |
| Abz-KLRQSKQ-EDDnp | 1,6 ± 0,04 | 0,73 ± 0,07 | 2.192 ± 76 |
| Abz-KLRRSKQ-EDDnp | 5,25 ± 0,07 | 1,35 ± 0,07 | 3.889 ± 91 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1,0 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |
| Abz-KLRVSKQ-EDDnp | 0,4 ± 0,007 | 0,38 ± 0,08 | 1.052,5 ± 0,5 |
| Abz-KLRWSKQ-EDDnp | 0,9 ± 0,06 | 0,93 ± 0,1 | 968 ± 0,5 |
| Abz-KLRYSKQ-EDDnp | 4,8 ± 0,03 | 1,4 ± 0,05 | 3.428,5 ± 83 |
| Substrato posição P₂ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
| Abz-KLRSAKQ-EDDnp | 4,4 ± 0,1 | 1,8 ± 0,2 | 2.444,5 ± 40 |
| Abz-KLRSDKQ-EDDnp | 1,7 ± 0,04 | 3,9 ± 0,2 | 436 ± 23,5 |
| Abz-KLRSEKQ-EDDnp | 0,6 ± 0,03 | 1,4 ± 0,02 | 428,5 ± 0,7 |
| Abz-KLRSFKQ-EDDnp | 0,5 ± 0,002 | 0,3 ± 0,05 | 1.666,5 ± 45 |
| Abz-KLRSGKQ-EDDnp | 0,7 ± 0,03 | 2,3 ± 0,2 | 304,5 ± 25 |
| Abz-KLRSHKQ-EDDnp | 3,2 ± 0,1 | 1,3 ± 0,4 | 2.461,5 ± 41 |
| Abz-KLRSKKQ-EDDnp | 3,5 ± 0,1 | 1,0 ± 0,15 | 3.500 ± 45 |
| Abz-KLRSLKQ-EDDnp | 5,4 ± 0,1 | 1,7 ± 0,15 | 3.176,5 ± 39 |
| Abz-KLRSMKQ-EDDnp | 1,9 ± 0,06 | 0,7 ± 0,05 | 2.714 ± 18 |
| Abz-KLRSNKQ-EDDnp | 2,8 ± 0,09 | 1,4 ± 0,1 | 2.000 ± 75 |
| Abz-KLRSPKQ-EDDnp | 3,4 ± 0,1 | 1,7 ± 0,2 | 2.000 ± 78 |
| Abz-KLRSQKQ-EDDnp | 0,5 ± 0,01 | 0,6 ± 0,01 | 833,5 ± 23 |
| Abz-KLRSRKQ-EDDnp | 5,8 ± 0,07 | 1,8 ± 0,03 | 3.222 ± 50 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1,0 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |
| Abz-KLRSWKQ-EDDnp | 0,9 ± 0,01 | 0,6 ± 0,02 | 1.500 ± 47 |
| Abz-KLRSYKQ-EDDnp | 4,15 ± 0,09 | 1,5 ± 0,15 | 2.766,5 ± 29 |
| Substrato posição P₃ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 1,65 ± 0,06 | 1,0 ± 0,08 | 1.650 ± 72 |

Condições de hidrólise: Tampão HEPES (0,1 M), pH 7,0 a 50 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes

A5. Parâmetros cinéticos da hidrólise da série de peptídeo FRET em serino peptidase

| Substrato posição P₁ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|--|----------------------------------|---|
| Abz-KLFSSKQ-EDDnp | 0,12 ± 0,02 | 0,78 ± 0,1 | 154 ± 3,2 |
| Abz-KLHSSKQ-EDDnp | 0,20 ± 0,007 | 6,5 ± 0,3 | 31 ± 1,5 |
| Abz-KLISSKQ-EDDnp | 0,08 ± 0,012 | 0,4 ± 0,07 | 200 ± 3,5 |
| Abz-KLKSSKQ-EDDnp | 0,18 ± 0,003 | 1,4 ± 0,3 | 128,5 ± 3,5 |
| Abz-KLLSSKQ-EDDnp | 0,5 ± 0,05 | 1,5 ± 0,03 | 333,5 ± 8,5 |
| Abz-KLMSSKQ-EDDnp | 0,86 ± 0,03 | 6,5 ± 0,4 | 132,5 ± 7,5 |
| Abz-KLNSSKQ-EDDnp | 0,10 ± 0,004 | 0,5 ± 0,01 | 200 ± 3,5 |
| Abz-KLQSSKQ-EDDnp | 0,20 ± 0,003 | 2,3 ± 0,3 | 87 ± 1,4 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,002 | 0,4 ± 0,02 | 150 ± 9 |
| Abz-KLSSSKQ-EDDnp | 0,27 ± 0,06 | 18 ± 2 | 15 ± 1 |
| Abz-KLTSSKQ-EDDnp | 0,09 ± 0,01 | 1,25 ± 0,07 | 72 ± 4 |
| Abz-KLYSSKQ-EDDnp | 0,4 ± 0,003 | 1,5 ± 0,2 | 266,5 ± 3,5 |
| Abz-KLDSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KLESSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KLPSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KLVSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KLWSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Substrato posição P₂ | <i>k_{cat}</i> (s⁻¹) | <i>K_M</i> (μM) | <i>k_{cat}/K_M</i> (mM⁻¹s⁻¹) |
| Abz-KARSSKQ-EDDnp | 0,3 ± 0,05 | 4,7 ± 0,6 | 64 ± 1 |
| Abz-KFRSSKQ-EDDnp | 0,12 ± 0,008 | 3,1 ± 0,25 | 39 ± 0,5 |
| Abz-KHRSSKQ-EDDnp | 0,09 ± 0,006 | 0,5 ± 0,02 | 180 ± 5,7 |
| Abz-KIRSSKQ-EDDnp | 0,10 ± 0,008 | 3,4 ± 0,04 | 29,5 ± 0,4 |
| Abz-KKRSSKQ-EDDnp | 0,04 ± 0,06 | 0,3 ± 0,03 | 133,5 ± 17 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,002 | 0,4 ± 0,02 | 150 ± 9 |
| Abz-KMRSSKQ-EDDnp | 0,18 ± 0,025 | 5,5 ± 0,07 | 33 ± 0,4 |
| Abz-KNRSSKQ-EDDnp | 0,07 ± 0,003 | 1,5 ± 0,1 | 46,5 ± 3 |
| Abz-KQRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,001 | 0,9 ± 0,006 | 66,5 ± 0,4 |
| Abz-KRRSSKQ-EDDnp | 0,05 ± 0,001 | 0,35 ± 0,01 | 143 ± 7 |
| Abz-KSRSSKQ-EDDnp | 0,12 ± 0,003 | 3,5 ± 0,15 | 34 ± 1,5 |
| Abz-KVRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,003 | 1,2 ± 0,15 | 50 ± 6 |
| Abz-KYRSSKQ-EDDnp | 0,07 ± 0,001 | 1,8 ± 0,05 | 39 ± 3,5 |
| Abz-KDRSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KERSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KGRSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |
| Abz-KWRSSKQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |

| Substrato posição P₃ | k_{cat} (s⁻¹) | K_{M} (μM) | $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM⁻¹s⁻¹) |
|--|---|---------------------------------------|---|
| Abz-ALRSSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,025 | 7,5 ± 0,2 | 26,5 ± 0,8 |
| Abz-DLRSSKQ-EDDnp | 0,08 ± 0,003 | 6,5 ± 1,5 | 12,5 ± 0,5 |
| Abz-ELRSSKQ-EDDnp | 0,15 ± 0,01 | 5,5 ± 0,4 | 27 ± 0,7 |
| Abz-FLRSSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,01 | 7,0 ± 0,1 | 28,5 ± 1 |
| Abz-HLRSSKQ-EDDnp | 0,36 ± 0,015 | 1,2 ± 0,2 | 300 ± 4,2 |
| Abz-ILRSSKQ-EDDnp | 0,09 ± 0,002 | 0,65 ± 0,04 | 138,5 ± 9 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,002 | 0,4 ± 0,02 | 150 ± 9 |
| Abz-LLRSSKQ-EDDnp | 0,11 ± 0,001 | 0,1 ± 0,005 | 1.100 ± 26,5 |
| Abz-MLRSSKQ-EDDnp | 0,08 ± 0,008 | 1,0 ± 0,05 | 80 ± 4,8 |
| Abz-NLRSSKQ-EDDnp | 0,21 ± 0,01 | 7,5 ± 0,1 | 28 ± 3 |
| Abz-QLRSSKQ-EDDnp | 0,04 ± 0,003 | 0,15 ± 0,001 | 266,5 ± 12,5 |
| Abz-SLRSSKQ-EDDnp | 0,31 ± 0,005 | 2,0 ± 0,2 | 155 ± 11 |
| Abz-TLRSSKQ-EDDnp | 0,36 ± 0,001 | 6,0 ± 0,01 | 60 ± 3 |
| Abz-VALRSSKQ-EDDnp | 0,12 ± 0,0001 | 0,15 ± 0,001 | 800 ± 7,7 |
| Abz-WLRSSKQ-EDDnp | 0,13 ± 0,01 | 8,8 ± 0,03 | 15 ± 0,6 |
| Abz-YLRSSKQ-EDDnp | 0,2 ± 0,02 | 0,45 ± 0,06 | 444,5 ± 13 |

Condições de hidrólise: Tampão HEPES (0,1 M), pH 7,0 a 45 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.

| Substrato posição P'₃ | <i>k</i>_{cat} (s⁻¹) | <i>K</i>_M (μM) | <i>k</i>_{cat}/<i>K</i>_M (mM⁻¹s⁻¹) |
|---|--|----------------------------------|--|
| Abz-KLRSSAQ-EDDnp | 0,21 ± 0,01 | 6,3 ± 0,5 | 33,5 ± 2,6 |
| Abz-KLRSSDQ-EDDnp | 0,1 ± 0,006 | 1,15 ± 0,004 | 87 ± 3 |
| Abz-KLRSSSEQ-EDDnp | 0,07 ± 0,001 | 3 ± 0,0001 | 23,5 ± 1 |
| Abz-KLRSSFQ-EDDnp | 0,08 ± 0,001 | 1,6 ± 0,001 | 50 ± 3 |
| Abz-KLRSSGQ-EDDnp | 0,68 ± 0,002 | 39,8 ± 2 | 17 ± 0,5 |
| Abz-KLRSSHQ-EDDnp | 0,14 ± 0,002 | 2,9 ± 0,07 | 48 ± 0,7 |
| Abz-KLRSSIQ-EDDnp | 0,05 ± 0,004 | 0,22 ± 0,007 | 227 ± 8 |
| Abz-KLRSSKQ-EDDnp | 0,06 ± 0,002 | 0,4 ± 0,02 | 150 ± 9 |
| Abz-KLRSSLQ-EDDnp | 0,06 ± 0,0005 | 1,0 ± 0,001 | 60 ± 0,7 |
| Abz-KLRSSMQ-EDDnp | 0,09 ± 0,002 | 0,5 ± 0,003 | 180 ± 3 |
| Abz-KLRSSPQ-EDDnp | 0,09 ± 0,02 | 1,8 ± 0,1 | 50 ± 3 |
| Abz-KLRSSQ-EDDnp | 0,07 ± 0,001 | 0,8 ± 0,007 | 87,5 ± 0,5 |
| Abz-KLRSSRQ-EDDnp | 0,09 ± 0,001 | 5,2 ± 0,4 | 17,5 ± 1,5 |
| Abz-KLRSSSQ-EDDnp | 0,24 ± 0,04 | 5 ± 0,01 | 48 ± 1 |
| Abz-KLRSSSTQ-EDDnp | 0,09 ± 0,005 | 0,65 ± 0,02 | 138,5 ± 4,3 |
| Abz-KLRSSVQ-EDDnp | 0,08 ± 0,001 | 5,7 ± 0,8 | 14 ± 0,3 |
| Abz-KLRSSWQ-EDDnp | 0,63 ± 0,004 | 26 ± 1 | 24 ± 0,5 |
| Abz-KLRSSYQ-EDDnp | 0,20 ± 0,008 | 4,8 ± 0,15 | 41,5 ± 1 |
| Abz-KLRSSNQ-EDDnp | Sem hidrólise | | |

Condições de hidrólise: Tampão HEPES (0,1 M), pH 7,0 a 45 °C. Os valores correspondem à média de triplicatas de experimentos independentes.

A7. Sumário das características bioquímicas das peptidases descritas neste trabalho.

| | Peptidase aspártica | Cisteíno peptidase | Serino peptidase |
|---|--|--|--|
| Fungo produtor | <i>Rhizomucor miehei</i> | <i>Phanerochaete chrysosporium</i> | <i>Leptosphaeria</i> sp. |
| Principal fonte de nitrogênio em BSm | Caseína 0,5% | Pena de frango 2% (triturada) | Pena de frango 2% (triturada) |
| Temperatura de cultivo | 45 °C | 30 °C | 30 °C |
| Tempo de cultivo BSm | 24 horas | 96 horas | 96 horas |
| Resinas utilizadas para purificação | Sephadex G-50 Sephacryl S-100 | Sephadex G-50 Source 15S | Sephadex G-50 Source 15S |
| Recuperação final da enzima pura | 2,7% | 11% | 3,5% |
| Massa molecular estimada | 37 kDa | 23 kDa | 35 kDa |
| Máxima atividade por efeito de pH | 5,5 | 7,0 | 7,0 |
| Máxima atividade por efeito de temperatura | 55 °C | 45-55 °C | 45 °C |
| Estabilidade em pH (atividade residual acima de 80%) | pH ácido (pH 3-5) | Faixa de pH 4-8 | Faixa de pH 5-9 |
| Termoestabilidade | 70% de atividade em incubação por 60 min. a 45 °C | 90% de atividade em incubação por 60 min. a 50 °C | 40% de atividade em incubação por 10 min. a 40 °C |
| Inibição da atividade enzimática | Pepstatina A | Ácido iodocético N-Etilmaleimida | PMSF |
| Principais agentes químicos na redução da atividade enzimática | SDS, CTAB, guanidina e DTT | SDS, CTAB, guanidina e DTT | SDS, CTAB, guanidina e DTT |
| Redução da atividade enzimática por efeito de íons | BaCl ₂ , KCl, CaCl ₂ , CoCl ₂ , MnCl ₂ , MgCl ₂ , AlCl ₃ , CuCl ₂ | BaCl ₂ , KCl, CaCl ₂ , CoCl ₂ , MnCl ₂ , MgCl ₂ , AlCl ₃ , CuCl ₂ | AlCl ₃ , CoCl ₂ , CuCl ₂ |
| Aumento da atividade enzimática por efeito de íons | ----- | ----- | NaCl, LiCl, MgCl ₂ , KCl, CaCl ₂ , MnCl ₂ |
| Especificidade catalítica | Aminoácidos básicos, apolares e aromáticos. Baixa aceitação por resíduos ácidos | Aminoácidos básicos, principalmente em P ₃ e alta especificidade por lisina em P' ₃ | Aminoácidos básicos, apolares e polares neutros. Baixa aceitação por resíduos ácidos |