



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

RONIVALDO RODRIGUES DA SILVA

FERMENTAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE
PRODUZIDA PELO FUNGO *Aspergillus fumigatus* Fresenius

São José do Rio Preto

Novembro, 2011



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

RONIVALDO RODRIGUES DA SILVA

FERMENTAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE
PRODUZIDA PELO FUNGO *Aspergillus fumigatus* Fresenius

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre 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

Novembro, 2011

Silva, Ronivaldo Rodrigues da.

Fermentação, purificação e caracterização da protease produzida pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius / Ronivaldo Rodrigues da Silva. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.
58 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Hamilton Cabral
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Enzimas proteolíticas. 3. Enzimas de fungos. 4. Fermentação. 5. *Aspergillus fumigatus* Fresenius. I. Cabral, Hamilton. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.15

RONIVALDO RODRIGUES DA SILVA

FERMENTAÇÃO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE
PRODUZIDA PELO FUNGO *Aspergillus fumigatus* Fresenius

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre 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.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hamilton Cabral
Professor Doutor
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Rodrigo Simões Ribeiro Leite
Professor Adjunto (Doutor)
Depto. de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Grande Dourados

Prof^ª. Dra. Fabiana Fonseca Zanoelo
Professor Adjunto (Doutor)
Depto. de Ciências Biológicas e da Saúde
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

São José do Rio Preto, 16 de novembro de 2011

Dedico este trabalho a todos meus familiares e amigos que contribuíram e que, mesmo diante de tantas dificuldades, sempre acreditaram em meu sucesso e me apoiaram nesta jornada. 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, irmão, cunhada e sobrinho, os quais são minha fortaleza e inspiração pra não desistir.

Ao Prof. Dr. Hamilton Cabral que acreditou em meu trabalho abrindo as portas na minha vida científica e que sempre se fez presente em minha orientação pessoal e científica.

Também agradeço ao Prof. Dr. Fabio Renato Lombardi, Prof^ª. Maria Luíza Salioni que, juntamente com Prof. Dr. Hamilton Cabral, ocupam o espaço, verdadeiramente, de amigos-pais em minha vida, com os quais tenho eterna dívida de gratidão.

Agradeço ao Dr. Lucas, alguém que ainda não conheço pessoalmente, mas que tenho imensa vontade de conhecer. Obrigado pela confiança e incentivo!

Aos amigos de laboratório Ana Claudia, Andrezza, Tamara, Youssef e Rafael Biaggio que contribuíram diretamente na realização deste trabalho, sendo partes integrantes na minha vida pessoal e científica.

Agradeço a Tatiana e Nathalia, pessoas que contribuíram intensamente em partes fundamentais deste trabalho e mostraram-se verdadeiras amigas e co-orientadoras. Obrigado!

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

RESUMO

A produção de proteases de origem microbiana depende das condições de cultivo e da diversidade bioquímica de cada espécie. Estudos comparativos entre fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FSm) usando farelo de trigo e meio sintético, respectivamente, foram realizados para a determinação dos parâmetros de produção de proteases pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius. A melhor produção de protease foi em FES no período de 96 horas utilizando farelo de trigo, temperatura de 30 °C e 1×10^6 esporos/5g de substrato com 1.517 U/mL. Em FSm o pico de produção foi em pH 6,0, a 30°C, 5×10^5 esporos/mL de meio no período de 72 e 96 horas em meio contendo 0,5 e 0,25% de caseína, respectivamente, ambos com 40 U/mL. Conforme a produtividade dos processos fermentativos, o extrato enzimático da FES foi utilizado para estudos de purificação e caracterização bioquímica. Neste estudo, a protease purificada apresentou atividade ótima em pH 7,5 e 50°C, sendo inibida por Fenil-metil-sulfonil-fluoreto (PMSF) e mais intensamente por antipaína (1,6 μ M). Sobre efeito de íons, foi observado modulação da atividade proteolítica, principalmente com inibição por $AlCl_3$, cuja atividade proteolítica residual foi de 18% após incubação com este íon. Na presença de Ditioneitol (DTT) e uréia houve diminuição da atividade proteolítica, apresentando atividades residuais de 63% em 200 mM de DTT e 10% com 5 M de uréia. Comparativamente, na concentração de 0,1% de cada surfactante estudado, notou-se redução da atividade proteolítica, sendo 97% em presença de Brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB), 79% para 4 - (1,1,3,3 - Tetrametilbutil) fenil-polietileno glicol (Triton X-100), 55% com Polyoxyethylenesorbitan monolaurato (Tween-20) e completa redução da atividade (0%) em presença de Dodecil sulfato de sódio (SDS). Nos estudos cinéticos com substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (Abz-KLRSSKQ-EDDnp) observou-se maior eficiência catalítica com substrato contendo aminoácido leucina na posição P_3' .

Palavras chaves: Protease, Fermentação em estado sólido, Fermentação submersa, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, caracterização bioquímica funcional.

ABSTRACT

The microbial protease production depends on growing conditions and the biochemical diversity of each species. Comparative studies between solid-state fermentation (SSF) and submerged fermentation (SmF) using wheat bran and synthetic medium, respectively, were performed to determine the optimum parameters for protease production by the fungus *Aspergillus fumigatus* Fresenius. The best protease production was in SSF within 96 hours using wheat bran, temperature 30°C and 1×10^6 spores/5g of substrate, with 1,517 U/mL. In SmF peak production was at pH 6.0 at 30°C, 5×10^5 spores/mL of media within 72 and 96 hours in medium containing 0.5 and 0.25% casein, respectively, with 40 U/mL. According to the productivity of the fermentative processes, enzymatic extract was used from SSF to study purification and biochemical characterization. In this study, purified protease showed optimum activity at pH 7.5 and 50°C, and inhibited by Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and more intensely for antipain (1,6 μ M). Concerning to the effect of ions, we observed modulation of the proteolytic activity, especially with inhibition by $AlCl_3$, which residual activity was of 18 % after incubation with this ion. In the presence of Dithiothreitol (DTT) and ureia, we observed progressive decrease in proteolytic activity, presenting residual activities of 63% with 200 mM DTT, and 10% with 5 M ureia. Comparatively, in the concentration of 0.1% of each surfactant studied, there was a reduction in the proteolytic activity in 97% in presence of Cetyl trimethylammonium bromide (CTAB), 79% with 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton X-100), 55% with Polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween-20) and a complete inactivation in the presence of Sodium dodecyl sulfate (SDS). In kinetic studies with internally quenched fluorescence peptides (KLRSSKQ-Abz-EDDnp) described highest catalytic efficiency with substrates containing leucine amino acid at position P₃'.

Key Words: Protease, Solid state fermentation, Submerged fermentation, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, biochemical characterization

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 ENZIMAS	15
1.2 PROTEASES	15
1.2.1 Proteases fúngicas	16
1.3 APLICAÇÕES ECONÔMICAS DE PROTEASES	16
1.3.1 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica	16
1.3.2 Proteases aplicadas na indústria de cosmético	17
1.3.3 Proteases aplicadas na produção de detergentes	17
1.3.4 Proteases aplicadas na indústria de couro e tratamento de resíduos	18
1.3.5 Proteases aplicadas em alimentos	18
1.4 FERMENTAÇÕES E MICRORGANISMO EM BIOTECNOLOGIA	19
1.4.1 Processo de fermentação biotecnológica	19
1.4.1.1 Fermentação submersa (FSm)	19
1.4.1.2 Fermentação em estado sólido (FES)	20
1.4.2 Microrganismos utilizados em biotecnologia	20
1.4.2.1 Fungo: <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	20
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO	23
3.2 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	23
3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)	23
3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)	24
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA	24
3.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	25
3.7 ELETROFORESE SDS-PAGE	26
3.8 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL	26
3.8.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência	26
3.8.2 Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional	27
3.8.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease	27

3.8.4	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	27
3.8.5	Efeito de inibidores na atividade proteolítica	28
3.8.6	Efeito de íons e surfactantes na atividade da protease	28
3.8.7	Efeito de DTT na atividade da protease	28
3.8.8	Efeito de uréia na atividade da protease	28
3.9	ESTUDOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA	29
3.9.1	Determinação da concentração molar da enzima purificada	29
3.9.2	Ensaio cinéticos com substrato sintético	29
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1	PROCESSOS FERMENTATIVOS	30
4.1.1	Influência de diferentes parâmetros fermentativos na produção de proteases	30
4.1.1.1	<i>Efeito da composição do meio na produção de proteases em FES</i>	30
4.1.1.2	<i>Efeito de indutor na produção de proteases em FSm</i>	32
4.1.1.3	<i>Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FES</i>	32
4.1.1.4	<i>Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FSm</i>	33
4.1.1.5	<i>Efeito da temperatura na produção de proteases em FES e FSm</i>	34
4.1.1.6	<i>Efeito de fontes de carbono na produção de proteases em FSm</i>	35
4.1.1.7	<i>Efeito do pH inicial do meio na produção de proteases em FSm</i>	36
4.2	PURIFICAÇÃO	37
4.2.1	Precipitação da enzima com etanol	37
4.2.2	Cromatografias	37
4.2.3	Determinação da massa molar da protease produzida por <i>A. fumigatus</i> Fresenius	39
4.3	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL DA PROTEASE	40
4.3.1	Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease	40
4.3.2	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease	42

4.3.3 Determinação do mecanismo de ação da protease	43
4.3.4 Efeito de íons na atividade da protease	44
4.3.5 Efeito de surfactantes na atividade da protease	45
4.3.6 Efeito de DTT na atividade da protease	47
4.3.7 Efeito de uréia na atividade da protease	48
4.4 PARÂMETROS CINÉTICOS DOS SUBSÍTIOS CATALÍTICOS DA PROTEASE PRODUZIDA POR <i>A. fumigatus</i> Fresenius	48
5. CONCLUSÕES	53
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Crescimento <i>Aspergillus fumigatus</i> Fresenius	21
Figura 2	Fluxograma de atividades desenvolvidas	23
Figura 3	Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência	27
Figura 4	Efeito da composição do meio (Farelo de Trigo e ovo albumina) na produção de proteases em FES	30
Figura 5	Efeito da composição do meio (Farelo de Trigo e caseína) na produção de proteases em FES	31
Figura 6	Efeito de caseína na produção de proteases em FSm	32
Figura 7	Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FES	33
Figura 8	Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FSm	34
Figura 9	Efeito do pH inicial do meio na produção de proteases em FSm	36
Figura 10	Cromatograma Filtração em gel em resina sephadex G-75	37
Figura 11	Cromatograma Filtração em gel em resina sephadex G-50	38
Figura 12	Eletroforese gel poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%	39
Figura 13	Efeito do pH na atividade da protease produzida por <i>A. fumigatus</i> em FES	40
Figura 14	Efeito do pH na estabilidade da protease produzida por <i>A. fumigatus</i> em FES	41
Figura 15	Efeito da temperatura na atividade da protease produzida por <i>A. fumigatus</i> em FES	42
Figura 16	Efeito da temperatura na estabilidade da protease produzida por <i>A. fumigatus</i> em FES	43
Figura 17	Efeito de SDS na atividade da protease produzida em FES	46

Figura 18	Efeito de Tween-20, CTAB e Triton X-100 na atividade proteolítica	46
Figura 19	Efeito de DTT na atividade proteolítica	47
Figura 20	Efeito de uréia na atividade proteolítica	48
Figura 21	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₁	49
Figura 22	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₂	49
Figura 23	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₃	50
Figura 24	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₁ '	51
Figura 25	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₂ '	51
Figura 26	Parâmetros cinéticos de hidrólise da série de peptídeo P ₃ '	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Efeito de temperatura na produção de proteases em FES e FSm	35
Tabela 2	Efeito de fontes de carbono na FSm	36
Tabela 3	Etapas de purificação da protease produzida por FES	38
Tabela 4	Efeito de inibidores na atividade da protease	44
Tabela 5	Efeito de íons na atividade proteolítica	45

Abreviações utilizadas

Abreviações dos aminoácidos

Aminoácido	Abreviação 3 letras	Abreviação 1 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	Ácido orto-aminobenzóico
CTAB	Brometo de cetil-trimetil amônio
DTT	Ditiotreitol
EDDnp	2,4-etilenodiaminodinitrofenil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FES	Fermentação em estado sólido
FRET	Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência
F _{Sm}	Fermentação submersa
PMSF	Fenilmetilsulfonilflúor
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
U/mL.	Unidade de Atividade/ mL
UV	Ultravioleta
TRITON X-100	4 - (1,1,3,3 - Tetrametilbutil) fenil- polietileno glicol
TWEEN 20	Polyoxyethylenesorbitan monolaurato

1. INTRODUÇÃO

1.1 ENZIMAS

Enzimas são biocatalisadores de um vasto repertório de reações químicas sendo a principal ferramenta empregada na síntese e quebra de moléculas essenciais ao crescimento e vida de todos os organismos (HOLLIDAY; MITCHELL; THORNTON, 2009).

Devido a sua especificidade e seletividade de atuação sobre substratos quando comparada a catalisadores químicos (VOET; VOET, 2006), enzimas vêm sendo utilizadas em processos biotecnológicos e industriais apresentando grande participação no comércio mundial (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

O mercado mundial de enzimas está dividido em enzimas industriais, que correspondem a 60% do mercado industrial e enzimas especiais, tais como, enzimas terapêuticas, para diagnóstico e pesquisa, cujo aumento esperado é da ordem de 40% para 2014. As principais enzimas industriais são proteases, carboidrases (amilases, celulasas e xilanasas), lipases e fitases. Estão divididas em três segmentos de mercado: enzimas técnicas aplicadas em produtos de limpeza, têxtil, couros, álcool como combustível e papel; enzimas para alimentos e bebidas; e enzimas para ração animal (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

1.2 PROTEASES

Proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas de moléculas protéicas e peptídeos (KUMAR; TAKAGI, 1999). Constituem um grupo único de enzimas que ocupam uma posição central com aplicações em vários campos, tais como, processos fisiológicos e patológicos e aplicações comerciais em várias áreas (KUMAR; TAKAGI, 1999).

As proteases são classificadas de acordo com sua fonte (animal, vegetal, microbiana), sua ação catalítica (exoproteases e endoproteases) ou de acordo com a natureza do seu sítio catalítico (serino, sulfidrílicas, ácidas e metalo) (PALMA et al., 2002).

As proteases são amplamente distribuídas entre os organismos vivos. Exercem diferentes funções, tais como, degradação de proteínas “velhas”, proteção contra invasores, processos fisiológicos e outras. São controladas por mecanismos que envolvem controle gênico, produção de zimogênios, ativação e inibição enzimática (GARCIA-CARREÑO; DEL TORO, 1997).

1.2.1 Proteases fúngicas

As proteases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e têm sido estudadas extensivamente (GUPTA et al., 2002).

Fungos filamentosos apresentam intensa produção de enzimas hidrolíticas incluindo as proteases, sendo sua produção dependente das condições de crescimento tais como, temperatura, fonte de carbono e nitrogênio. A fonte de nitrogênio do meio afeta o crescimento e a produção de enzima extracelular, uma vez que muitas proteases são produzidas e secretadas somente na presença de proteínas como fonte de nitrogênio no meio de cultura (BAZARZHAPOV et al., 2006).

Organismos termofílicos, adaptados a altas temperaturas do meio ambiente, são capazes de produzir proteases excepcionalmente termoestáveis. Devido a essa característica essas proteases são candidatas apropriadas para aplicações em processos industriais, tais como, processamento de couro, detergentes, síntese de peptídeos, indústria de alimentos, aplicações biotecnológica e farmacêutica (ZHU et al., 2007).

Além disso, as proteases termofílicas também são modelos moleculares ideais para investigação e elucidação dos mecanismos de estabilidade físico-química das proteínas (ZHU et al., 2007), além de seus estudos na compreensão das estruturas protéicas (SELLEK; CHAUDHURI, 1999).

1.3 APLICAÇÕES ECONÔMICAS DE PROTEASES

No uso comercial de enzimas, as proteases apresentam-se em destaque, correspondendo a 60% do total de enzimas produzidas no mundo, (NASCIMENTO; MARTINS, 2006) sendo sua maior aplicação na indústria de detergentes e laticínio (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

1.3.1 Proteases aplicadas na indústria farmacêutica

Enzimas proteolíticas são amplamente usadas em práticas médicas, como por exemplo, algumas colagenases que podem ser empregadas na remoção de manchas e quelóides, outras no tratamento de queimaduras e úlceras (SUKHOSYROVA et al., 2003).

Proteases queratinolíticas com atividade sobre proteínas fibrosas e insolúveis (queratinas) também estão sendo estudadas para a remoção de calosidade humana. Outra possível aplicação das queratinases é na remoção da queratina no tratamento da acne, psoríase e micoses causadas por fungos dermatófitos (BON; VERMELHO, 2004).

As enzimas proteolíticas poderiam, também, ser aplicadas clinicamente no tratamento da diarreia celíaca (doença celíaca ou enteropatia sensível ao glúten), uma vez que nesta patologia a ingestão de proteínas do glúten presente no trigo, centeio e cevada é inviabilizada em condições metabólicas normais do portador da doença (SHAN et al., 2002).

O principal componente tóxico do glúten de trigo é a proteína gliadina com regiões ricas em Pro e Gln (SHAN et al., 2002). Proteases específicas em hidrolisar resíduos de prolina são chaves terapêuticas para estas doenças do sistema digestivo. As prolil endopeptidases ou prolil oligopeptidases pertencente ao grupo das serino proteases, possuem a capacidade de hidrolisar a ligação peptídica na posição X-Pro ou Pro-X. Estas enzimas específicas são amplamente distribuídas em bactérias, fungos, animais e plantas (SHAN et al., 2004).

1.3.2 Proteases aplicadas na indústria de cosmético

Nos produtos cosméticos as enzimas são consideradas componentes muito importantes, como as proteases que hidrolisam ligações peptídicas do colágeno e queratina da pele (SIM et al., 2000).

Enzimas como a papaína, bromelina e outras proteases têm sido utilizadas sobre a pele para realização de alisamento e *peeling*. A ação dessas proteases está relacionada com a renovação celular, exercendo atividade queratinolítica, promovendo a remoção das células mortas presentes na epiderme e restauração da mesma (LODS et al., 2000).

Proteases que apresentam atividade proteolítica sobre colágeno, queratina e elastina, são empregadas em alguns processos da indústria de cosméticos, tais como cremes esfoliantes e pomadas (GUPTA et al., 2002).

1.3.3 Proteases aplicadas na produção de detergentes

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

O uso de proteases no preparo de detergentes responde pelo maior emprego comercial de proteases e sua aplicação se deve a atividade e estabilidade em pH alcalino e altas

temperaturas, além de sua ação em uma ampla variedade de substratos protéicos em combinação com amilases, celulasas e lipases (RAO et al., 1998).

1.3.4 Proteases aplicadas na indústria de couro e tratamento de resíduos

Em curtumes as proteases ocorrem como forma alternativa no tratamento do couro, substituindo aditivos químicos perigosos, como sulfeto de sódio que pode contaminar o solo e efluentes. Dessa forma o uso de proteases assegura a redução da poluição ambiental e também melhoria na qualidade do couro, sendo sua ação baseada na hidrólise seletiva de proteínas não colágenas e não fibrosas (RAO et al., 1998).

Proteases alcalinas também são utilizadas na degradação de proteínas fibrosas animais, como penas, chifres, cabelos e unhas. Essa ação enzimática pode gerar biomassa útil a partir da hidrólise da queratina disponibilizando aminoácidos e peptídeos que podem ser utilizados como aditivos protéicos em ração animal (ANWAR; SALEEMUDDIN, 1997).

1.3.5 Proteases aplicadas em alimentos

Uma das aplicações de proteases na indústria de alimentos é na obtenção de hidrolisados protéicos de forma a melhorar o sabor e a qualidade do alimento (BHASKAR et al., 2007; FITZGERALD; O'CUINN, 2006).

Esses hidrolisados de proteína, em geral, podem apresentar sabor amargo decorrente da liberação de resíduos peptídicos contendo aminoácidos hidrofóbicos em suas extremidades e resíduo de prolina no centro da molécula. Nesse sentido, para remoção do gosto amargo, algumas endo e exoproteases têm sido amplamente estudadas como valiosas ferramentas de clivagem específica de aminoácidos hidrofóbicos e prolina (FITZGERALD; O'CUINN, 2006).

Na produção de queijos, proteases são empregadas na coagulação do leite através da hidrólise da ligação peptídica (Phe 105-Met 106). Entre as proteases utilizadas neste processo destaca-se a ação da quimosina (renina) (EC 3.4.21.4) sendo a protease preferida devido a alta especificidade pela k-caseína (RAO et al., 1997).

Segundo Sinha et al. (2007), as proteínas do soro de leite, resultante do processo de produção de queijo, apresentam alto valor nutritivo e vem ganhando aceitação na utilização como suplemento alimentar de derivados lácticos. Essas proteínas constituem-se de aminoácidos essenciais e aminoácidos sulfonados (cisteína), de importante função antioxidante. A hidrólise dessas proteínas é realizada por proteases ácidas e alcalinas, que

disponibiliza peptídeos livres biologicamente ativos e que têm sido empregados como importante fonte de aminoácidos em casos de intolerância infantil a proteínas do leite.

Na panificação, enzimas proteolíticas podem ser empregadas como aditivos no preparo de massas, como por exemplo, proteases de *Aspergillus oryzae* cuja ação sobre o 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 (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

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

1.4 FERMENTAÇÕES E MICRORGANISMO EM BIOTECNOLOGIA

1.4.1 Processo de Fermentação biotecnológica

Entende-se por fermentação industrial o processo de crescimento microbiano em condição aeróbia ou anaeróbia sob parâmetros físicos-químicos determinados (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Diversos produtos de interesse industrial são gerados como, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, álcool, antibióticos e enzimas (DEMAIN, 2007).

A produção de enzimas é realizada basicamente por dois estados de fermentação biotecnológica como, Fermentação Submersa (FSm) e Fermentação em Estado Sólido (FES), cujas diferenças no estado de fermentação e composição do meio são determinantes na produção de enzimas (SANDHYA et al., 2005; PANDEY, 2003).

1.4.1.1 Fermentação Submersa (FSm)

Neste processo, o microrganismo se desenvolve em meio de cultivo líquido, sob agitação. Esse método, em fermentador industrial, permite o controle de fatores ambientais tais como pH, temperatura e oxigenação, além de garantir a homogeneização de nutrientes, calor e células microbianas no meio de cultivo (SINHA; SINHA, 2009).

Apresenta vantagens como controle dos parâmetros fermentativos e maior eficiência de absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula microbiana (SINHA; SINHA, 2009) e desvantagens como maior requerimento energético e hídrico, com altos custos em aeração e agitação (BON; FERRARA; CORVO, 2008)

1.4.1.2 Fermentação em estado sólido (FES)

Entende-se por este processo o crescimento microbiano em meio sólido na ausência de água livre. Todavia é necessário que o substrato esteja suficientemente umedecido para suportar o crescimento e metabolismo microbiano (PANDEY, 2003).

Este processo caracteriza-se por apresentar vantagens como baixo requerimento energético, menor gasto hídrico e simplicidade do meio de cultivo, permitindo o emprego de resíduos agroindustriais como matéria prima na produção de enzimas (PANDEY, 2003); e desvantagens como menor acessibilidade ao substrato, dificuldade de controle de variáveis físico-químicas (pH, temperatura, oxigenação) e dificuldade de transferências de nutrientes (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

1.4.2 Microrganismos utilizados em biotecnologia

Microrganismos são empregados na geração de diversos produtos em processos fermentativos em função da diversidade bioquímica, facilidade de crescimento, facilidade de adaptação em diferentes ambientes e possibilidade de manipulação genética (DEMAIN, 2007).

O sucesso de fungos filamentosos na geração de produtos de aplicação industrial é garantido pela larga versatilidade metabólica desses microrganismos. Alguns fungos filamentosos são conhecidos por produzir ácidos orgânicos, polissacarídeos, enzimas, alcalóides e antibióticos (EL- ENSHASY, 2007). Os fungos de maior exploração industrial até o momento incluem espécies de *Aspergillus* sp., como *A. awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. nidulans*; *Trichoderma reesei* e *Mucor michie* (VAN DEN HOMBERGH et al., 1997; BON; FERRARA; CORVO, 2008).

1.4.2.1 Fungo: *Aspergillus fumigatus* Fresenius

O fungo filamentoso *Aspergillus fumigatus* Fresenius é amplamente encontrado na natureza vivendo de maneira saprobiótica ou saprofítica ocorrendo em matéria orgânica em decomposição (TEKAIA; LATGÉ, 2005). Na **figura 1** observa-se o crescimento de *A. fumigatus* em meio CYA.

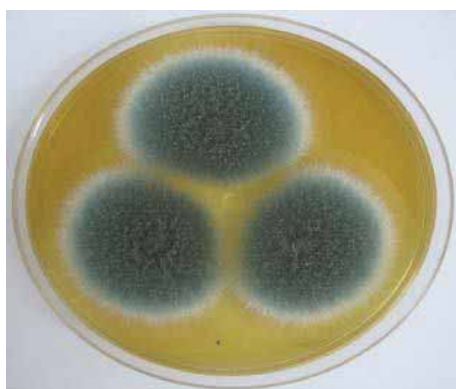


Figura1. Crescimento de *A. fumigatus* Fresenius
Meio CYA a 30°C. (Foto cedida: André Rodrigues)

O fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius apresenta ampla diversidade bioquímica sendo capaz de produzir distintas classes de proteases e com variadas massas molares (WANG et al., 2005). Tem sido relatada a produção de serino protease (REICHARD et al., 1990; LARCHER et al., 1992; WANG et al., 2005), protease aspártica (REICHARD; EIFFERT; RUCHEL, 1994; REICHARD; MONOD; RUCHEL, 1995) e metalo protease (MONOD et al., 1993; MARKARYAN et al., 1994).

A produção microbiana de protease obedece a condições próprias de cada espécie e também ao meio utilizado para fermentação, estando sujeita a diferenças de produção entre a FSm e FES (SANDHYA et al., 2005; ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008). Nesse sentido, fungos filamentosos tem sido largamente explorados como fonte produtora de proteases devido a sua habilidade de crescimento e ampla variedade de produção (ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008).

A produção de proteases por espécies do gênero *Aspergillus* têm sido amplamente estudada, devido a sua capacidade de secretar altos níveis de enzimas em seu ambiente de crescimento (WU et al., 2006). O fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius apresenta alta capacidade e diversidade de produção de proteases em diferentes condições de cultivo. Tais diferenças em produção reforçam o interesse de novos estudos investigando a variedade bioquímica deste fungo, detalhando as singularidades das proteases produzidas em estudos de caracterização bioquímica funcional.

Dessa forma, consoante a diversidade microbiana e a sua habilidade de produção de enzimas e, considerando os diferentes estados de fermentação e as distintas composições dos meios de cultivo como fator de grande influência na produção de proteases, torna-se importante o estudo do efeito dessas variáveis no processo fermentativo, a determinação das características bioquímicas funcionais e o estudo cinético da protease produzida por *Aspergillus fumigatus* Fresenius.

2. OBJETIVOS

Investigar o perfil de produção de proteases nos processos fermentativos submerso e sólido do fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius segundo variações nos fatores de produção como temperatura de fermentação, concentração de esporos, tempo de fermentação, tipo e concentração do substrato e indutor de proteases, efeito de fontes de carbono e pH inicial do meio (FSm).

Purificar a protease produzida por *Aspergillus fumigatus* Fresenius de acordo com o rendimento de produção em cada processo fermentativo.

Realizar ensaios de caracterização bioquímica funcional da protease purificada, tais como determinação do efeito de temperatura e pH na atividade proteolítica, estabilidade de temperatura e pH, efeito de inibidores, íons, surfactantes, DTT e uréia.

Realizar estudos dos parâmetros cinéticos da protease purificada utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMO

O fungo *Aspergillus fumigatus* Fresenius foi isolado de madeira em decomposição no município de São José do Rio Preto/SP. O fungo foi identificado em colaboração com o Prof. Dr. André Rodrigues vinculado a Universidade Estadual de Santa Cruz – Ilhéus/BA, através de técnicas de bioquímica e biologia molecular.

3.2 FLUXOGRAMA DE ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A **figura 2** representa o fluxograma das etapas realizadas para produção, purificação e caracterização bioquímica da protease produzida neste trabalho.

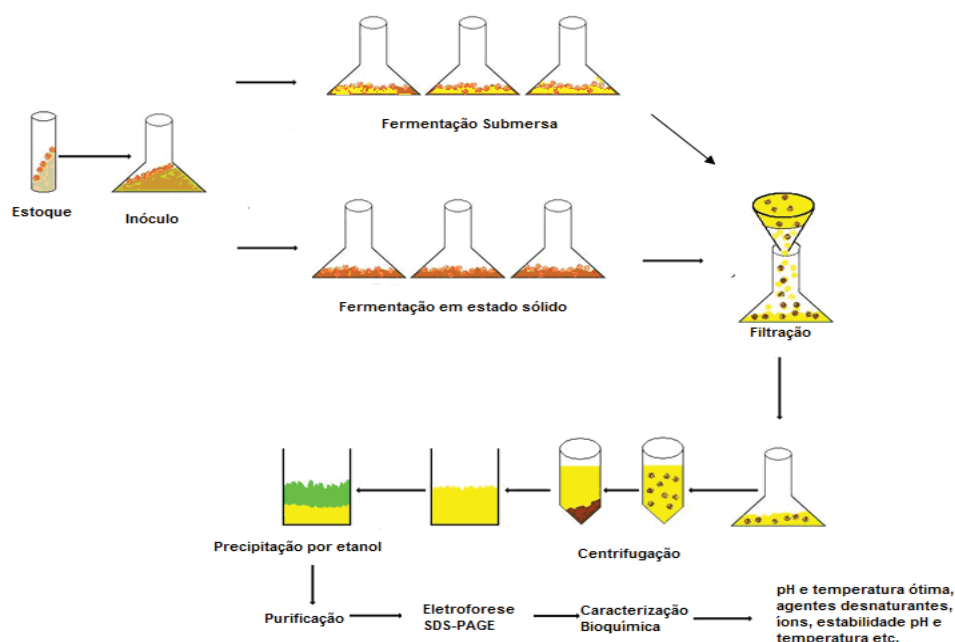


Figura 2. Fluxograma das etapas de fermentação, purificação e caracterização bioquímica da protease produzida por *Aspergillus fumigatus* Fresenius

3.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A produção de protease pela linhagem do fungo *A. fumigatus* na fermentação em estado sólido foi avaliada utilizando-se o resíduo agro-industrial farelo de trigo.

Em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 5g de farelo de trigo umedecido com 10 mL de solução nutriente contendo 0,1% (m/v) dos seguintes sais:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e NH_4NO_3 . Todo material foi autoclavado por 40 minutos a 121°C (MERHEB et al., 2007).

O inóculo foi realizado com 5×10^6 esporos para cada 5g de resíduo e a fermentação foi conduzida durante 168 horas sendo que a cada 24 horas o material foi removido e solubilizado em 40 mL de água deionizada a 4°C . O material homogeneizado foi centrifugado a $5,000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da atividade proteolítica.

Vários parâmetros influenciam a produção de enzimas durante a fermentação em estado sólido, assim foram realizadas investigações sobre o efeito da variação dos tipos de indutores (caseína e albumina do ovo) e as concentrações (5, 10 e 20%) utilizadas, concentrações de esporos ($0,1 \times 10^6$, 1×10^6 , $2,5 \times 10^6$ e 5×10^6), e temperaturas de fermentação (30, 35, 40 e 45°C), avaliando as melhores condições de produção da protease.

3.4 FERMENTAÇÃO SUBMERSA

Em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 50mL do meio líquido composto por 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%; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,01% e peptona 1% (TRAN; NAGANO, 2002). O meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

O meio foi inoculado com suspensão de esporos inicial de 5×10^6 esporos/mL de meio e incubado em agitador tipo *shaker* de rotação orbital a 150 rpm à 30°C por período de 168 horas, sendo que a cada 24 horas o material foi removido. O material fermentado foi filtrado em papel Whatman nº 1 e em seguida centrifugado a $5.000 \times g$ por 20 minutos em 4°C . O sobrenadante foi utilizado para a quantificação da atividade proteolítica e o micélio mantido em estufa à 45°C , até atingir peso constante, para fins de determinação da biomassa micelial.

Foram realizadas investigações sobre o efeito de fontes de carbono (sacarose, glicose e frutose) e suas porcentagens (0,1, 0,5 e 1%), porcentagens do indutor caseína (0,25, 0,5 e 1%), pH inicial do meio (5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 e 8,5), temperatura de fermentação (30, 35, 40 e 45°C) e concentrações de inóculo (1×10^5 ; $2,5 \times 10^5$; 5×10^5 e 10×10^5 esporos/mL de meio).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

A atividade proteolítica foi determinada em ensaio enzimático utilizando caseína como substrato (SARATH; de la MOTTE; WAGNER, 1996).

A reação enzimática considerou a hidrólise da caseína e, como produto da reação a liberação de aminoácidos e fragmentos peptídicos que apresentam absorção de luz UV no comprimento de onda 280 nm (Tyr, Trp). A mistura de reação foi composta por tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M, pH 6,5, solução caseína 1% e enzima, sendo incubada a 37°C. O tempo de reação foi contabilizado e a atividade proteolítica mensurada em unidade de atividade em função do tempo de reação. A reação foi interrompida com adição de Ácido Tricloroacético (TCA) 10%, e os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000xg em temperatura ambiente, sendo o sobrenadante utilizado para leitura em espectrofotômetro em 280 nm.

A atividade proteolítica foi expressa em U/mL, definida como a quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 μ mol de Tyr/min nas condições do ensaio (MEYERS; AHEARN, 1977).

3.6 PURIFICAÇÃO DA PROTEASE OBTIDA POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

O extrato enzimático proveniente da fermentação em estado sólido foi utilizado para prosseguimento dos estudos de purificação e caracterização bioquímica da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, uma vez que a produção em FES foi superior quando comparada a FSm.

O extrato enzimático bruto foi submetido a precipitação com etanol 92,8° INPM na proporção 1:2 (extrato enzimático:etanol) durante 24 horas à 0°C. Após este período foi centrifugado por 40 minutos a 3.000xg e 4°C. O concentrado protéico obtido foi ressuspensão em tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M pH 6,5.

Os ensaios cromatográficos foram realizados por filtração em gel utilizando resina Sephadex G-75 e G-50, sequencialmente. Antes da aplicação da amostra a resina foi previamente equilibrada com passagem de tampão correspondente a 1,5 vezes o volume da resina.

Ambos os processos cromatográficos de filtração em gel foram realizados em colunas com dimensões de 100 x 4cm (altura x diâmetro) e aplicados volume de amostra obedecendo ao volume recomendado (2-5% do volume de resina) para a resina Sephadex. O fluxo foi ajustado para 0,6 mL/min e utilizado tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,5. Foram coletados em tubos de ensaio 5 mL do eluído e todas as cromatografias foram conduzidas à temperatura de 4°C. Os tubos foram dosados quanto a atividade proteolítica e posteriormente analisados por eletroforese SDS-PAGE 12,5%.

Após cada processo cromatográfico a amostra do eluído protéico foi quantificada por método descrito por Bradford (1976) utilizando curva padrão com proteína BSA.

3.7 ELETROFORESE SDS-PAGE

A análise das frações obtidas em cada processo cromatográfico foi realizada por eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% de acordo com Laemmli (1970). As amostras foram aquecidas por 5 minutos a 96°C na presença do tampão de amostra (DTT, azul de bromofenol, SDS, glicerol e H₂O) e submetidas a eletroforese, após o procedimento o gel foi corado com nitrato de prata (SEE; JACKOWSKI, 1989).

3.8 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL

3.8.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência

O estudo de caracterização bioquímica funcional da protease pura foi realizado utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência. Esses substratos apresentam na região amino-terminal um grupo químico que responde pela fluorescência da molécula, ácido orto-aminobenzóico (Abz), e na região carboxi-terminal um grupo supressor da fluorescência, etilenodiamo-dinitro-fenil (EDDnp) (CHAGAS; JULIANO; PRADO, 1991).

Quando o substrato apresenta-se intacto o grupo EDDnp promove a supressão da região Abz apresentando assim baixa fluorescência. Em caso de clivagem do substrato por ação proteolítica (**Figura 3**), a separação e o distanciamento entre os grupos EDDnp e Abz permite que ocorra aumento da fluorescência por não haver supressão do grupo ácido orto-aminobenzóico (Abz) (SANTOS, 2009).

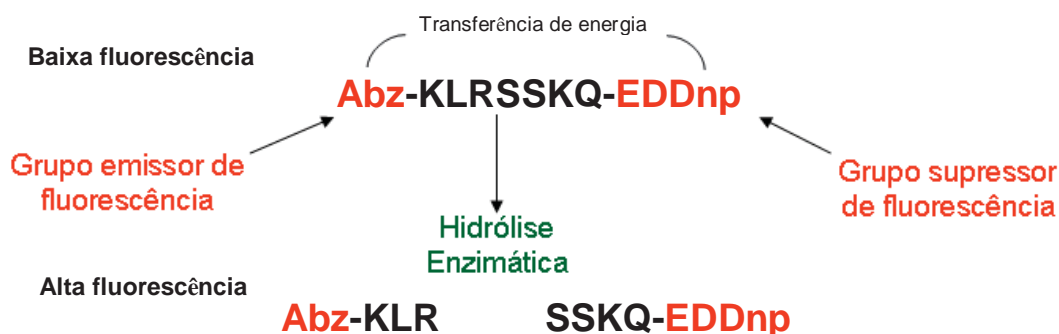


Figura 3. Esquema da funcionalidade do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência demonstrando as diferenças de fluorescência na forma íntegra (íntacta) do substrato e na forma hidrolisada por ação enzimática (SANTOS, 2009).

3.8.2 Condições de ensaio da reação enzimática na caracterização bioquímica funcional

A reação enzimática foi realizada em espectrofluorímetro modelo F-4500 (Hitachi, Japão) com agitação magnética em cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Os comprimentos de ondas foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

A mistura de reação padrão foi composta por enzima, tampão Hepes 0,05 M pH 7,5, substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp e conduzida à temperatura de 40°C.

3.8.3 Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A determinação do pH ótimo de atividade proteolítica foi realizada à 40°C em diferentes valores de pH utilizando os seguintes tampões 0,05 M: 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 e 10,5). A estabilidade de pH foi estudada com incubação da enzima por 1 hora a 25°C nos diferentes valores de pH.

Em ambos os ensaios o substrato utilizado foi Abz-KLRSSKQ-EDDnp, sendo a concentração final da enzima 0,5 nM e do substrato 420 nM.

3.8.4 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

A influência da temperatura na atividade da protease obtida do processo fermentativo sólido foi investigada de 35°C a 80°C com variações de 5°C.

A estabilidade térmica foi determinada incubando a enzima nas temperaturas de 30°C a 55°C em períodos de 5, 30, e 60 minutos. Em seguida a atividade proteolítica foi realizada

em espectrofluorímetro com substrato sintético, Abz-KLRSSKQ-EDDnp, sendo a concentração final da enzima 0,5 nM e do substrato 420 nM.

3.8.5 Efeito de inibidores na atividade proteolítica

A determinação do mecanismo de ação foi realizada segundo o protocolo descrito por Dunn (1989) com modificações. Foram utilizados os seguintes inibidores Ácido Iodoacético, PMSF, EDTA e pepstatina com concentração final de 5 mM. Além desses inibidores também foi testado o efeito de antipaína com concentração final de 1 µM.

A enzima pura na concentração de 0,5 nM foi previamente misturada com cada inibidor, adicionado tampão Hepes 0,05 M pH 7,5 e mantida incubada a 40°C por 5 minutos. Após esse período o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp na concentração de 420 nM foi adicionado e a fluorescência monitorada.

3.8.6 Efeito de íons e surfactantes na atividade da protease

A presença de íons na mistura de reação foi estudada na concentração final de 10mM para os seguintes íons metálicos KCl, CaCl₂, MgCl₂, CoCl₂, MnCl₂, BaCl₂ e AlCl₃.

O efeito de surfactantes na protease foi analisado com variações crescentes nas porcentagens de SDS, CTAB, Tween-20 e Triton X-100.

Em ambos os estudos a enzima pura (0,5 nM) foi previamente incubada com cada agente químico (íons e surfactantes) na presença de tampão Hepes 0,05 M pH 7,5 e mantida a 40°C por 5 minutos. Posteriormente a atividade enzimática foi iniciada com adição do substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp (420 nM).

3.8.7 Efeito de DTT na atividade da protease

O efeito de DTT foi estudado nas concentrações crescentes de 10; 20; 40; 60; 80; 100; 150 e 200 mM. Em cubetas de quartzo a enzima foi pré-incubada com DTT e tampão Hepes 0,05M pH 7,5 e mantida a 40°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp, sendo que a concentração final da enzima 0,5 nM e do substrato 420 nM.

3.8.8 Efeito de uréia na atividade da protease

A influência da uréia como agente desnaturante na protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius foi avaliada em concentrações molares crescentes de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 M. Cada concentração molar de uréia foi pré-incubada com a

enzima pura e tampão Hepes 0,05 M pH 7,5 e mantida a 40°C por 5 minutos. Em seguida foi adicionado o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp (420 nM) e a fluorescência monitorada.

3.9 ESTUDOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

3.9.1 Determinação da concentração molar da enzima purificada

Para a realização dos estudos cinéticos foi determinada a concentração molar da enzima por titulação do sítio ativo com o inibidor antipaína, conforme descrito por Klemencic et. al (2000) com modificações, sendo estimada em 200 nM.

A concentração molar da enzima foi determinada em espectrofluorímetro F-4500 Hitachi utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em pH 7,5 a 40°C. Os comprimentos de onda de fluorescência foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

3.9.2 Ensaios cinéticos com substrato sintético

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

As cinéticas enzimáticas foram obtidas pela adição crescente de substrato na cubeta de reação. Os experimentos foram realizados em tampão Hepes 0,05 M pH 7,5 a 40°C em espectrofluorímetro F-4500 Hitachi com agitação magnética e controle de temperatura de reação. Os comprimentos de onda foram ajustados para λ_{ex} : 320nm e λ_{em} : 420nm.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROCESSOS FERMENTATIVOS

4.1.1 Influência de diferentes parâmetros fermentativos na produção de proteases

O processo de fermentação é fortemente influenciado pela composição do meio e, entre os parâmetros que afetam a produção de enzimas, destacam-se o tempo de fermentação, a concentração de esporos, a temperatura e as fontes suplementares de nutrientes, tais como carbono e nitrogênio (SUMANTA et al.,2005).

4.1.1.1 Efeito da composição do meio na produção de proteases em FES

A produção máxima de proteases pelo fungo *A. fumigatus* foi obtida usando farelo de trigo como substrato. O pico de produção foi de 1300 U/mL em 96 horas de fermentação (Figuras 4 e 5). Em meio suplementado com ovo albumina ou caseína como fonte de nitrogênio a produção máxima foi obtida na concentração de 5% de cada suplemento com pico de 580 U/mL (ovo albumina) (Figura 4), e 600 U/mL (caseína) (Figura 5), ambos no período de 72 horas de fermentação.

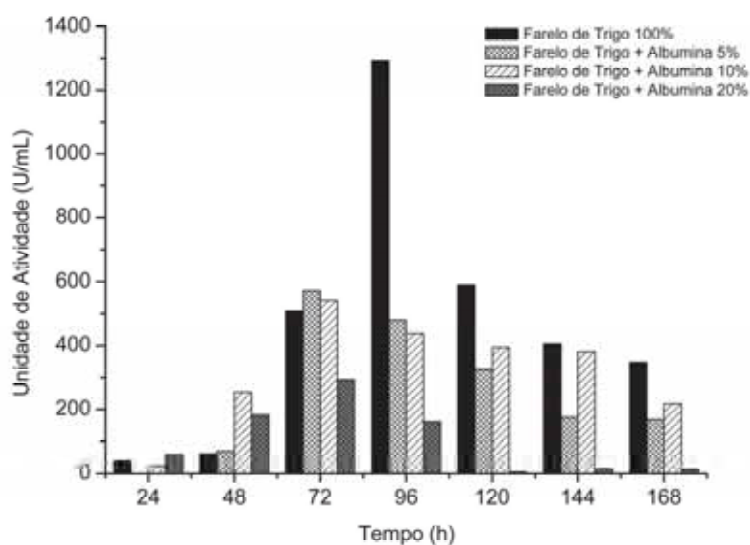


Figura 4. Efeito da composição do meio (farelo de trigo e ovo albumina) na produção de proteases em FES. Inoculo de 5×10^6 esporos/5g a 30°C

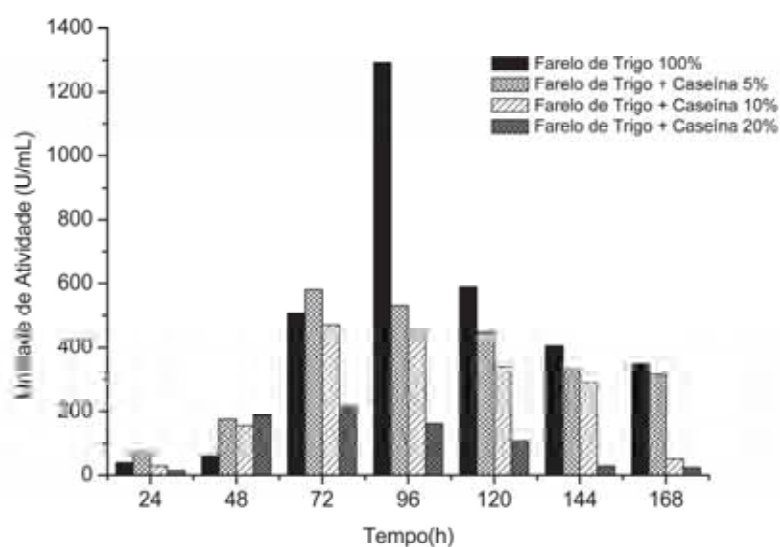


Figura 5. Efeito da composição do meio (farelo de trigo e caseína) na produção de proteases em FES. Inoculo de 5×10^6 esporos/5g a 30°C

Nesse estudo de FES, o farelo de trigo, sem suplementação protéica, proporcionou melhor desempenho na produção de protease. Outros estudos demonstraram que o farelo de trigo foi o melhor resíduo agroindustrial para a produção de proteases (SANDHYA et al., 2005; MACCHIONE et al, 2008). Entre as prováveis justificativas é possível apontar sua composição rica em proteínas: 18% de proteína, 5% de ácidos graxos e 62% de carboidratos (MADRUGA; CAMARA, 2000), além de textura e porosidade que facilitam o acesso e a dispersão de fungos (PANDEY, 2003).

Pode-se observar que na presença de albumina e caseína na porcentagem de 5% durante o período de 24 a 72 horas de fermentação a produção de protease foi induzida pela fonte de nitrogênio suplementar sendo que nesta porcentagem de suplemento protéico a produção foi superior ao obtido com substrato farelo de trigo em tempo equivalente de fermentação.

A possível explicação é que por esta fonte de nitrogênio estar prontamente mais acessível para hidrólise, liberando assim aminoácidos como fonte assimilável de nitrogênio, contribui mais ativamente para o crescimento fúngico e indução na produção de proteases durante este período de fermentação.

Nota-se que, em meio com suplementação de 20% de ovo albumina ou caseína o pico de produção foi de 300 U/mL e 200 U/mL, respectivamente, indicando que o aumento na

concentração da fonte de nitrogênio também age como repressor na produção de proteases. Resultados similares foram observados em *Actinomyces* com outras fontes de carbono (MEHTA; THUMAR; SINGH, 2006).

4.1.1.2 Efeito de indutor na produção de proteases em FSm

No estudo realizado em FSm foi avaliado o efeito da caseína como indutor na produção de proteases. Os níveis máximos de produção foram obtidos com 0,25% e 0,5% de caseína com 40 U/mL nos tempos de 72 e 96 horas de fermentação, respectivamente. Comparativamente ao pico de produção (40 U/mL), observou-se que, em FSm realizada com caseína 1% houve um declínio de 1,5 vezes na produção de proteases (**Figura 6**).

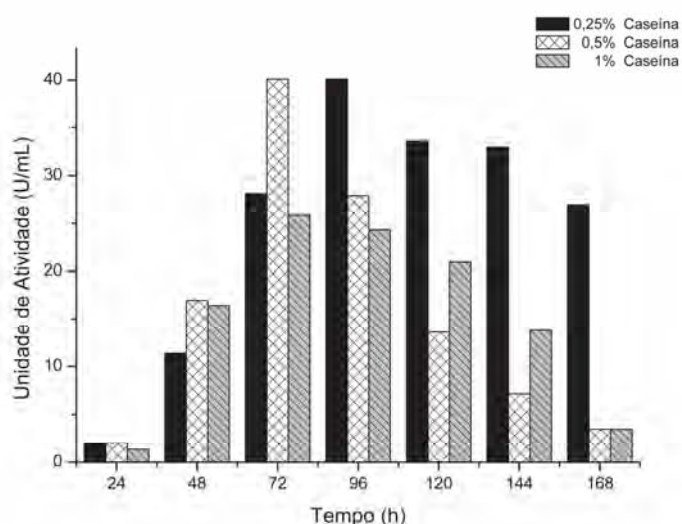


Figura 6. Efeito de indutor (caseína) na produção de proteases em FSm, pH 6,0, 5×10^5 esporos/mL de meio, 30°C e 150 rpm.

O estudo realizado em fermentação submersa (FSm) com indutor caseína mostrou efeito de modulação positiva na produção de proteases nas porcentagens de 0,25% e 0,5%, no entanto também observa-se uma tendência repressora, similar ao observado na FES, visto que os menores níveis de produção enzimática foram observados nos cultivos com as maiores concentrações de suplementos indutores utilizadas nesse estudo.

4.1.1.3 Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FES

A concentração de esporos inoculados foi outro parâmetro avaliado quanto à sua influência na produção enzimática. A melhor produção de enzimas proteolíticas em FES foi

obtida nos cultivos em concentrações de 1×10^6 e $2,5 \times 10^6$ esporos, com pico de produção em 1×10^6 esporos com 1.517 U/mL (**Figura 7**).

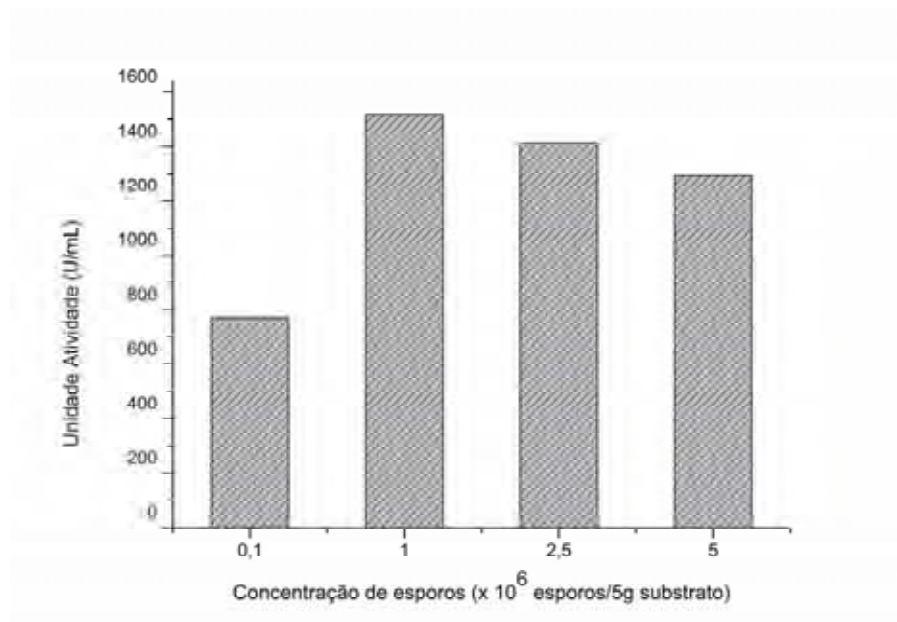


Figura 7. Picos da produção de proteases em FES. Meio com farelo de trigo (100%), inóculo de 5×10^6 esporos/5g a 30°C e tempo de 96 horas de fermentação

Outro dado observado foi que concentrações superiores à 1×10^6 esporos não proporcionaram melhor performance na produção de proteases, possivelmente como reflexo da densificação do meio. Fato similar também foi relatado por Sandhya et al. (2005) em estudos de FES com o fungo *Aspergillus oryzae*.

4.1.1.4 Efeito da concentração de esporos na produção de proteases em FSm

A concentração de esporos é um importante fator biológico que determina o crescimento fúngico na fermentação (SANDHYA et al., 2005). Neste estudo, a produção máxima foi alcançada com 5×10^5 esporos/mL de meio em 96 horas de fermentação com produção de 40 U/mL. (**Figura 8**).

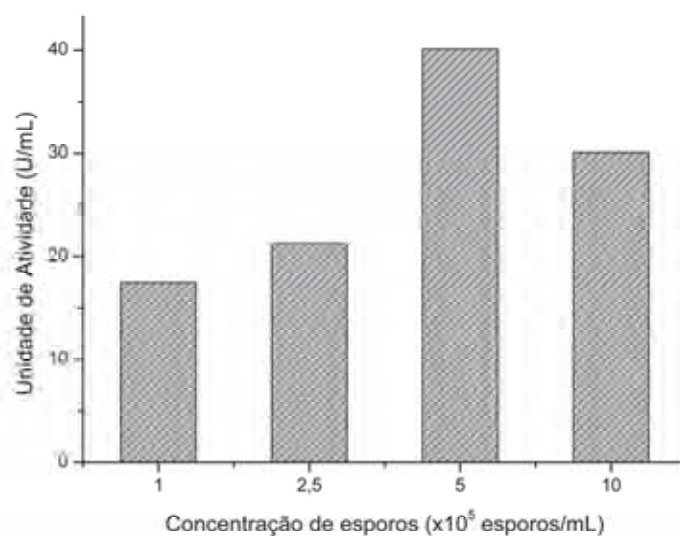


Figura 8. Picos da produção de proteases em FSm do fungo *A. fumigatus* Fresenius. Meio com 0,5% caseína, pH 6,0, 30°C, 150 rpm e tempo de 72 horas de fermentação.

A produção máxima com 5×10^5 esporos/mL de meio, sugere que nessa condição a concentração de nutrientes foi suficiente para o crescimento e produção de proteases, promovendo maior hidrólise de caseína e disponibilizando fontes de nitrogênio prontamente assimiláveis (aminoácidos) para o melhor crescimento fúngico.

Os resultados obtidos indicam uma linearidade entre a concentração de esporos e a produção de proteases nas concentrações de $1 - 5 \times 10^5$ esporos/mL, entretanto essa correlação não foi observada com a concentração de 10×10^5 esporos/mL. A diminuição na produção de proteases em altas concentrações de esporos também foi observada na FES desse estudo.

Observa-se que com 10×10^5 ou 1×10^5 esporos/mL de meio a produção de protease mostrou-se menor, indicando que concentrações de inóculos superiores ou inferiores a 5×10^5 esporos/mL podem, respectivamente, promover a densificação do meio ou ser insuficiente para a utilização completa dos nutrientes.

4.1.1.5 Efeito da temperatura na produção de proteases em FES e FSm

O aumento ou diminuição na temperatura de cultivo pode influenciar na dispersão micelial e na produção de enzima (SANDHYA et al, 2005). A melhor temperatura

de produção, de acordo com as temperaturas estudadas nos diferentes processos fermentativos, foi em 30°C (**Tabela 1**).

Tabela 1. Efeito da temperatura na produção de protease em FSm e FES.

Temperatura (°C)	Picos de produção FSm*	Picos de produção FES*
30	40	1300
35	39	477
40	16,3	425
45	6,5	84

*Picos de produção de proteases em diferentes temperaturas em FSm e FES

Meio FSm: 0,5% caseína, pH 6,0, 5×10^5 esporos/mL de meio, 150 rpm e tempo de 72 horas

Meio FES: Farelo de trigo (100%), 5×10^6 esporos/5g substrato e tempo de 96 horas

Entre as temperaturas avaliadas nesse estudo, os resultados mostraram uma relação inversamente proporcional entre a temperatura e a produção de protease. A redução na produção de proteases como decorrência do aumento da temperatura também foi observado no estudo com *Penicillium chrysogenum* (HAQ; MUKTAR; UMBER, 2006).

4.1.1.6 Efeito de fontes de carbono na produção de proteases em FSm

A influência da suplementação com fontes de carbono (sacarose, frutose e glicose) em diferentes concentrações foi avaliada em FSm.

A maior produção foi obtida no meio padrão (0,5% caseína e sem fonte de carbono) com 40 U/mL em 72 horas de fermentação, enquanto que nos cultivos suplementados houve uma repressão na produção de protease pelo fungo *A. fumigatus*.

As maiores produções nos cultivos com glicose, frutose e sacarose foram de 28; 26,5 e 19,5 U/mL nas concentrações de 0,5; 0,1 e 0,1% (**Tabela 2**), sendo que o fungo mostrou comportamento similar na presença de fontes de carbono, com baixa produtividade em maior tempo de fermentação.

Tabela 2. Efeito de diferentes fontes de carbono em diferentes porcentagens.

Fontes de Carbono	0%	0,1%	0,5%	1%
Meio Padrão	40	---	---	---
Glicose	---	18	28	13,5
Frutose	---	26,5	24,5	6,5
Sacarose	---	19,5	15,5	4,5

Picos de produção de proteases, pH 6,0, 5×10^5 esporos/mL de meio, 30°C e 150 rpm.

Meio padrão 72 horas e meios com fonte de carbono 168 horas de fermentação.

Os resultados sugerem que na presença de fontes de carbono prontamente assimilável o fungo *A. fumigatus* reage produzindo proteases tardiamente (168 horas) quando possivelmente esses carboidratos se apresentam escassos no meio submerso. Os resultados corroboram com os reportados em *Botrytis cinerea* de forma que foi descrita a repressão catabólica decorrente da adição de fontes de carbono no meio de cultivo (ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008).

4.1.1.7 Efeito do pH inicial do meio na produção de proteases em FSm

O pH do meio constitui um fator com grande influência no crescimento fúngico afetando mecanismos como secreção de enzimas e transporte celular (HAQ; MUKTAR; UMBER, 2006; SANDHYA et al., 2005). Os estudos mostraram maior produção de proteases em pH 6,0 (**Figura 9**).

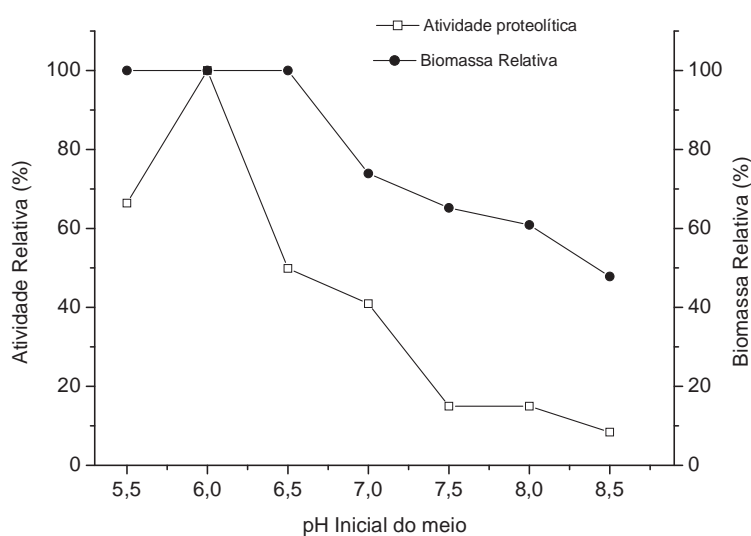


Figura 9. Efeito do pH inicial do meio na produção de proteases em FSm. Meio com 0,5% caseína, 5×10^5 esporos/mL de meio, 30°C e 150 rpm.

Neste pH o fungo apresentou o melhor crescimento e produção de enzimas, mostrando a existência de uma equivalência entre produção de proteases e o crescimento fúngico. De acordo com os resultados observa-se que o fungo *A. fumigatus* Fresenius apresenta características de crescimento e produção em meio ácido, pois com o aumento do pH inicial do meio nota-se significativa redução na produção de proteases. Comportamentos similares foram observados nos fungos *Penicillium chrysogenum* (HAQ; MUKTAR; UMBER, 2006) e *Aspergillus oryzae* (SANDHYA et al., 2005).

4.2 PURIFICAÇÃO

4.2.1 Precipitação da enzima com etanol

Inicialmente o extrato bruto originário da FES foi submetido à precipitação por etanol 92,8° INPM, em seguida o precipitado foi solubilizado (ressuspenso) em tampão fosfato de sódio monobásico 0,05 M pH 6,5 e utilizado em processos cromatográficos.

4.2.2 Cromatografias

Para a purificação do extrato enzimático bruto da FES foram realizados processos cromatográficos por filtração em gel com resinas Sephadex G-75 e G-50, sequencialmente.

Nesta etapa ocorreu pré- purificação do extrato enzimático com a eluição de três picos de proteínas, sendo que o perfil de eluição na cromatografia revelou que a protease estava presente no pico II, como mostrado no cromatograma (**Figura 10**).

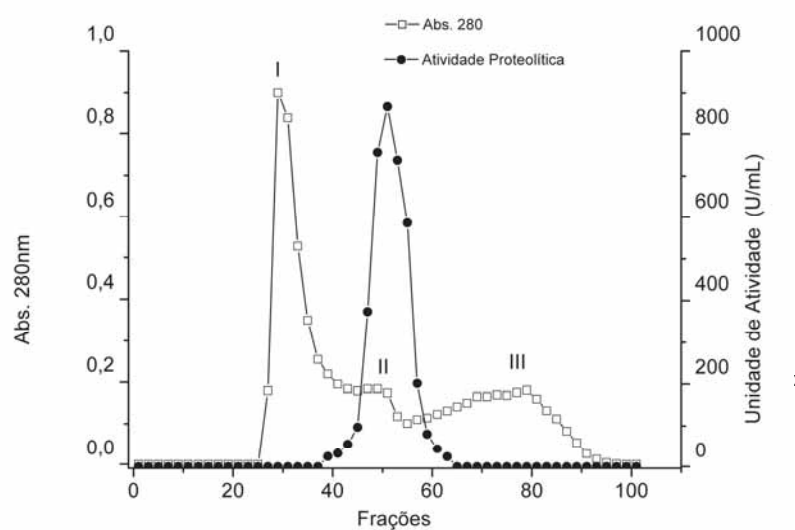


Figura 10. Perfil de eluição do processo cromatográfico utilizando resina Sephadex G-75

As melhores frações que apresentaram atividade proteolítica foram concentradas por ultrafiltração por membrana e aplicadas em cromatografia de filtração em gel com resina Sephadex G-50.

Como mostrado no cromatograma (**Figura 11**), conforme perfil de eluição foi observado cinco picos de proteínas, sendo a atividade proteolítica detectada somente no pico IV. Assim, os tubos correspondentes a este pico foram submetidos à eletroforese a analisado o grau de pureza da amostra. Posteriormente a enzima pura foi dialisada e concentrada para realização dos ensaios de caracterização bioquímica da protease.

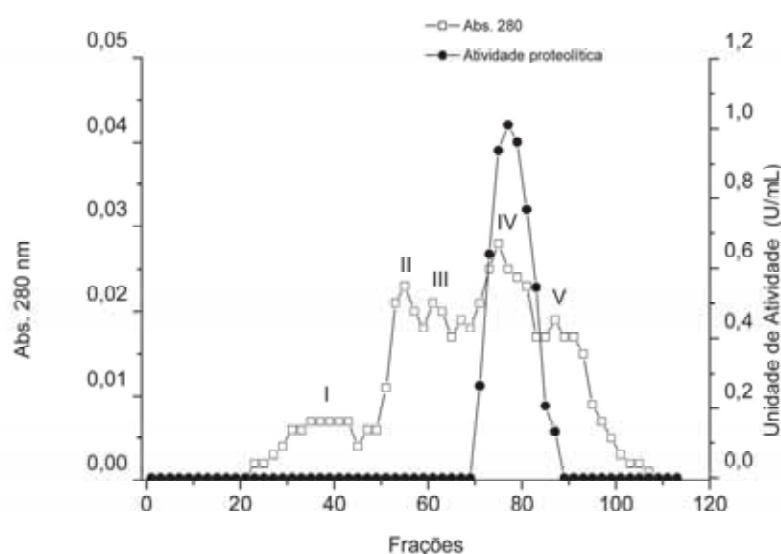


Figura 11. Perfil de eluição do processo cromatográfico utilizando resina Sephadex G-50

Como mostrado na **Tabela 3**, a amostra inicial precipitada com etanol 92,8° INPM apresentou recuperação de 88,8% e purificação de 2,6 vezes. A precipitação utilizando solventes orgânicos para enzimas fúngicas também foi descrita por outros autores (MERHEB-DINI et al., 2009; HAJJI et al., 2007).

Tabela 3. Etapas de purificação da protease de *A. fumigatus* Fresenius

Etapas de Purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Recuperação (%)	Purificação
Extrato bruto	3.976,0	438,0	9,1	100,0	1,0
Precipitado etanol	3.531,9	149,4	23,6	88,8	2,6
Sephadex G-75	2.736,6	21,0	130,3	68,8	14,3
Sephadex G-50	2.137,9	4,2	509,0	53,8	56,1

A amostra oriunda da precipitação com etanol e submetida a gel de filtração em resina Sephadex G-75 apresentou recuperação de 68,8% e purificação de 14,3.

Na etapa final de purificação a enzima pura, decorrente da cromatografia em gel de filtração Sephadex G-50 apresentou recuperação de 53,8% e purificação de 56,1. Tais resultados mostraram superioridade aos dados relatados em outros estudos de purificação de proteases de *A. fumigatus* Fresenius, como Larcher et al. (1992) com protease purificada apresentando recuperação de 22% e purificação de 39 vezes e Wang et al. (2005) com protease purificada apresentando recuperação de 25%.

4.2.3 Determinação da massa molar da protease produzida pelo fungo *A. fumigatus* Fresenius

A determinação da massa molar a partir de eletroforese em gel desnaturante SDS-PAGE foi estimada em aproximadamente 33 kDa (**Figura 12**).

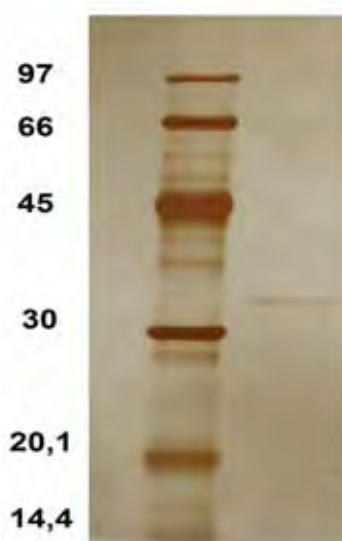


Figura 12. Eletroforese gel poliacrilamida SDS-PAGE 12,5%. Enzima purificada produzida por *A. fumigatus* Fresenius em FES.

Comparado aos resultados encontrados na literatura, observa-se que a serino-protease deste trabalho está de acordo com outras serino-proteases produzidas por *A. fumigatus*

Fresenius apresentando massa molar similar as proteases descritas por Reichard et al. (1990) e Larcher et al. (1992) com massas molares de 32 e 33 kDa respectivamente.

Outras classes de proteases produzidas por *A. fumigatus* Fresenius com massas molares parecidas também foram descritas por Reichard et al. (1995) e Reichard et al. (1994) descrevendo a produção de proteases aspártica com massas molares de 34,4 kDa e 38 kDa respectivamente.

A produção de metalo-proteases por *A. fumigatus* Fresenius também é destacada por Monod et al (1993) e Markaryan et al. (1994) com massas molares de 40 kDa e 43 kDa respectivamente.

4.3 CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA FUNCIONAL DA PROTEASE

4.3.1 Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A protease produzida por *A. fumigatus* em fermentação em estado sólido foi submetida a diferentes tampões na faixa de pH 4,5-10,5 para a avaliação do efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.

A reação foi realizada a 40°C e o perfil de atividade, segundo a variação de pH, mostrou que a protease possui atividade com tendência alcalina, sendo que o pH ótimo de atividade proteolítica foi pH 7,5 (**Figura 13**).

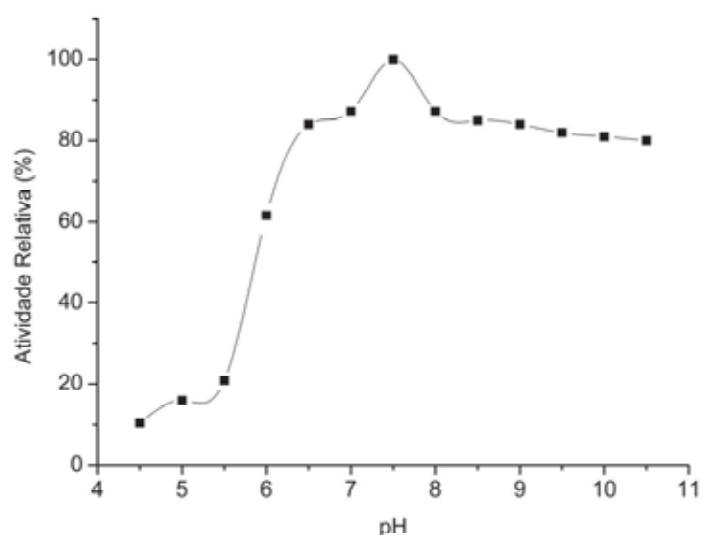


Figura 13. Efeito do pH sobre atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp

No estudo da estabilidade de pH a protease apresentou menor atividade proteolítica em pH ácido mantendo aproximadamente 60% de sua atividade residual em pH 5,0. No entanto, observa-se que com o aumento de pH a protease apresentou maior atividade relativa, sendo mais estável em pH alcalino principalmente na faixa de pH 9-11 (**Figura 14**).

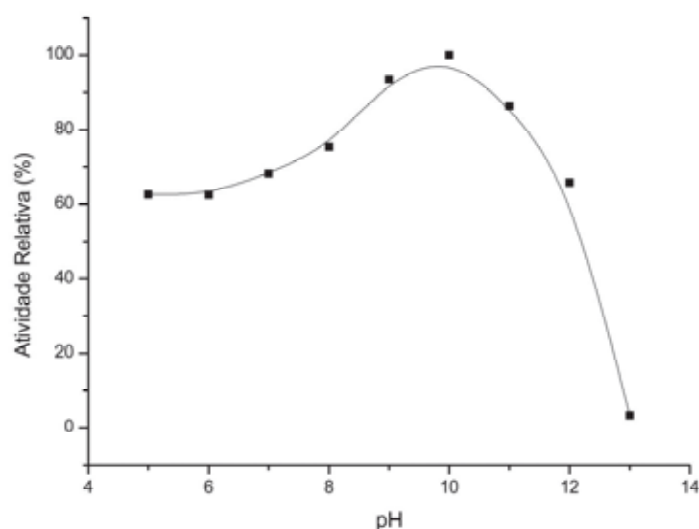


Figura 14. Efeito do pH sobre a estabilidade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp

Proteases alcalinas possuem muitas aplicações industriais, tais como: na indústria de detergentes, alimentos, farmacêutica, couro e processamento de resíduos orgânicos (FENG et al., 2001). Alguns trabalhos já demonstraram a produção de proteases alcalinas por espécies de *Aspergillus* (MALATHI; CHAKRABORTY, 1990; HAJJI et al., 2007; TUNGA; SHRIVASTAVA; BANERJEE, 2003).

Mais especificamente, a produção de proteases alcalinas por *A. fumigatus* também foi observada por Wang et al (2005) e Larcher et al (1992) que demonstraram proteases com atividade máxima em pH 8,0 e 9,0 respectivamente.

4.3.2 Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

O efeito da temperatura na atividade da protease foi estudado em pH 7,5. A atividade foi realizada na faixa de temperatura de 35 a 80°C, sendo a temperatura ótima alcançada em 50°C (**Figura 15**).

O perfil de atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius neste trabalho mostrou decréscimo gradual da atividade proteolítica quando incubada em temperaturas acima da temperatura ótima de 50°C.

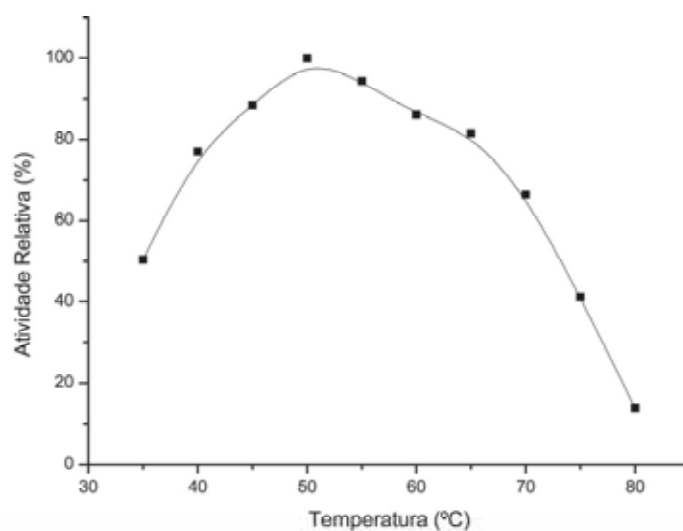


Figura 15. Efeito da temperatura sobre a atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

A temperatura ótima de atividade enzimática é um valor muito específico de cada enzima variando entre diferentes proteases produzidas por um mesmo fungo. Assim como nos estudos de Larcher et al (1992) e Wang et al. (2005) que também reportaram a produção de protease por *A. fumigatus* com atividade ótima em temperaturas de 42°C e 40°C, respectivamente. Nota-se que em ambos os trabalhos os valores de temperatura ótima são abaixo do obtido pela protease nesse estudo.

Para avaliar a estabilidade térmica, a enzima purificada foi exposta a diferentes temperaturas (na faixa de 30 à 55°C) por tempos de exposição variados (5, 30 e 60 minutos). Nas temperaturas de 30 e 35°C, a protease manteve atividade residual acima de 90% em todos os tempos de exposição. Na temperatura de 40°C a protease manteve atividade residual de

aproximadamente 90% nos tempos de 5 e 30 minutos e cerca de 85% de atividade residual após a exposição por 60 minutos. Na temperatura de 45°C a protease apresentou 80% de atividade residual em todos os tempos de incubação. Nas temperaturas de 50°C e 55°C a atividade residual manteve-se por volta de 80% até 30 e 5 minutos de exposição, respectivamente. (Figura 16).

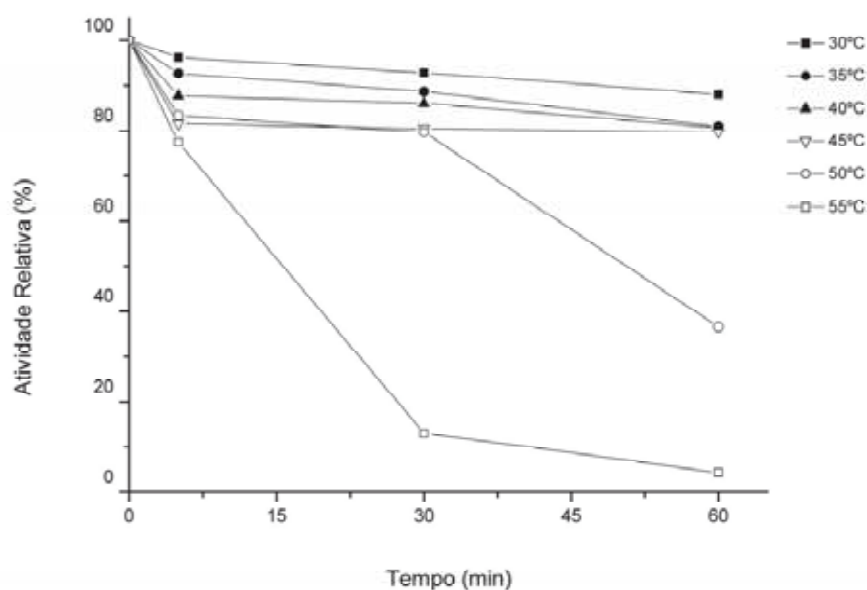


Figura 16. Efeito da temperatura sobre a estabilidade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

O perfil de atividade relativa da protease desse trabalho sugere que a enzima é menos estável em temperaturas superiores a 45°C, uma vez que a 50°C após 60 minutos de incubação a protease manteve 40% de atividade residual. Wang et al. (2005) mostraram que a 60°C a protease TKU003 apresentou 47% de atividade relativa após 30 minutos de incubação, enquanto que, nas mesmas condições, a protease produzida nesse estudo apresentou menos de 10% de atividade relativa.

4.3.3 Determinação do mecanismo de ação da protease purificada

O fungo *A. fumigatus* Fresenius tem demonstrado grande diversidade em produção enzimática, destacando a capacidade de secretar diferentes classes de proteases (WANG et al., 2005).

O mecanismo de ação catalítica da protease foi estudado com a incubação da enzima na presença de inibidores. Os resultados demonstraram que a maior redução da atividade proteolítica foi ocasionada por PMSF, sugerindo que a protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius pertence à classe de serino proteases.

Além disso, dentro do grupo de serino proteases foi avaliado a ação de antipaína, um inibidor específico para o clã *trypsina-like*. A maior inibição por antipaína sugere que a serino protease desse estudo pertence ao clã *trypsina-like* (**Tabela 4**).

Tabela 4. Efeito de inibidores na atividade da protease

Inibidores (5 mM)	Atividade Residual (%)
Controle	100,0
Pepstatina	97,0
EDTA	90,0
Ácido Iodoacético	84,0
PMSF	57,0
Antipaína (1 μ M)	1,6

A produção de serino proteases por *A. fumigatus* já foi anteriormente relatada por Reichard et. al (1990), Larcher et. al (1992) e Wang et. al (2005).

4.3.4 Efeito de íons na atividade da protease

Os íons podem ser determinantes na organização molecular da proteína e assim influenciar na atividade e estabilidade da enzima (MERHEB-DINI et al., 2009). No estudo sobre o efeito de íons metálicos na atividade proteolítica observou-se que o íon Ca^{+2} não apresentou efeito modulador da atividade. O íon K^{+} apresentou um leve efeito ativador e os demais íons promoveram diminuição da atividade enzimática, sendo o íon Al^{+3} o maior responsável pelo efeito repressor da atividade enzimática, reduzindo a 18% o nível de atividade residual (**Tabela 5**).

Tabela 5. Efeito de íons na atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius.

Íons (10 mM)	Atividade Residual (%)
Controle	100,0
KCl	108,0
CaCl ₂	100,0
MgCl ₂	76,0
CoCl ₂	77,0
MnCl ₂	75,0
BaCl ₂	78,0
AlCl ₃	18,0

Íons podem influenciar na atividade enzimática ao se ligarem a resíduos catalíticos ou a aminoácidos da enzima. O efeito modulador negativo ocasionado pelo íon Al⁺³ na atividade proteolítica pode ser justificado pela possível ligação do íon metálico na cadeia lateral do resíduo de serina que compõe a tríade catalítica das serino-proteases, promovendo assim a diminuição acentuada da atividade enzimática.

4.3.5 Efeito de surfactantes na atividade da protease

Surfactantes podem agir como agentes desnaturantes promovendo o rompimento de ligações não covalentes (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

O estudo da interferência de surfactantes na atividade proteolítica foi realizado em diferentes concentrações. Nota-se que SDS exerceu maior atividade desnaturante que os demais surfactantes. Na concentração de 0,04% de SDS houve redução da atividade proteolítica ao nível de 13%, enquanto que com 0,1% a inativação da protease foi completa (**Figura 17**).

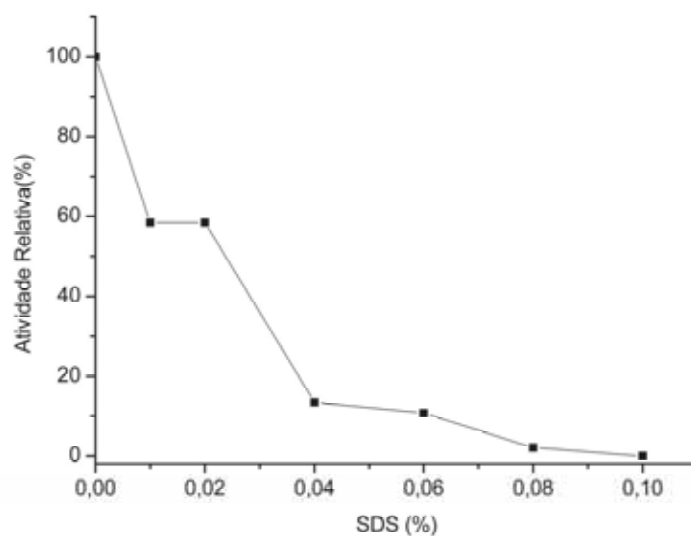


Figura 17. Efeito de SDS na atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Na mesma concentração de 0,1% para os demais surfactantes a protease apresentou atividade residual de 97% (CTAB), 79% (Triton X-100) e 55% (Tween-20) (**Figura 18**).

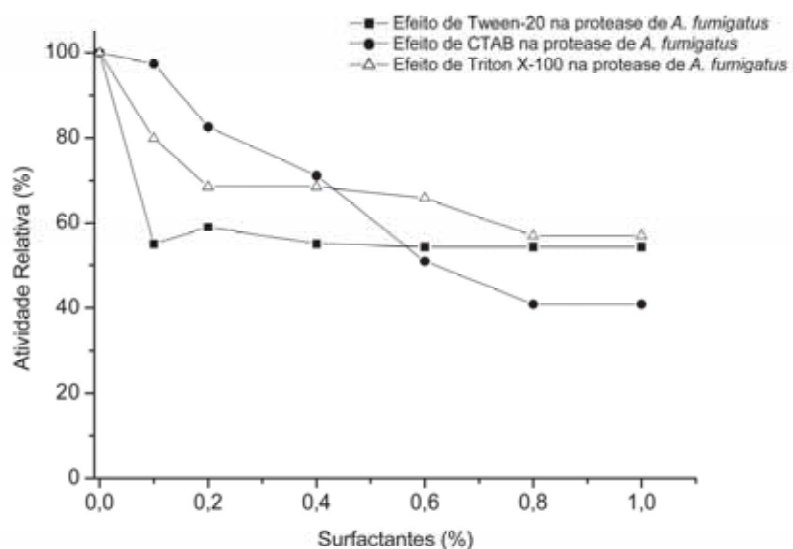


Figura 18. Efeito de Tween-20, CTAB e Triton X-100 na atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Estudos sobre efeito de surfactantes em proteases também demonstraram intensa inativação por ação de SDS, como foi mostrado por Hajji et al. (2007) em *Aspergillus clavatus* ES1 e Agrawal et al. (2004) em *Penicillium* sp.

4.3.6 Efeito de DTT na atividade da protease

Ditiotreitol (DTT) é um agente redutor que pode atuar como desnaturante promovendo o rompimento de possíveis ligações dissulfeto na proteína (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002).

O efeito de DTT foi avaliado em concentrações molares crescentes. Observa-se que em concentrações na faixa de 20-60 mM houve aumento da atividade proteolítica com máximo de ativação na concentração de 40 mM com aumento da atividade em 23%. Todavia o aumento progressivo na concentração de DTT promove queda da atividade enzimática com redução da atividade ao nível de 63% na concentração de 200 mM (**Figura 19**).

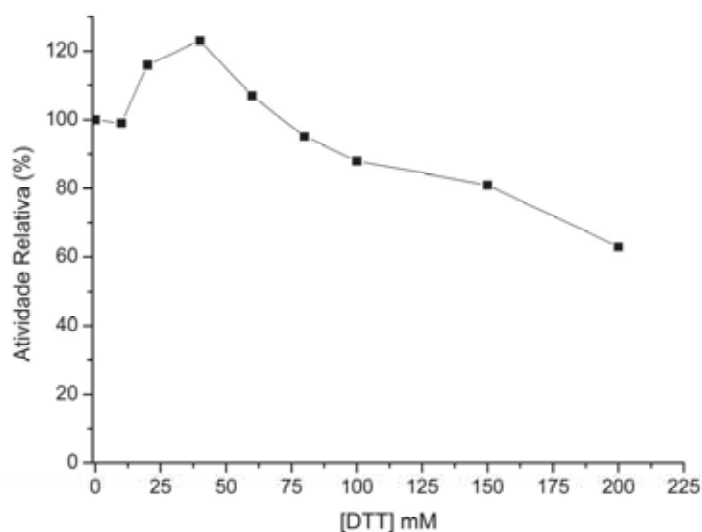


Figura 19. Efeito de DTT na atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Observa-se que na faixa de 20-60 mM houve aumento da atividade enzimática, indicando que a possível redução de resíduos peptídicos na enzima pode ter melhorado seu rendimento catalítico. No entanto com aumento progressivo na concentração molar de DTT nota-se declínio da atividade enzimática, sugerindo que o efeito redutor de DTT pode

desnaturar a proteína, rompendo pontes dissulfeto e ocasionando diminuição da atividade enzimática.

4.3.7 Efeito de uréia na atividade da protease

A uréia é um agente caotrópico que interfere com as ligações de pontes de hidrogênio na proteína, exercendo assim atividade desnaturante sobre a molécula protéica (ROCCO et al., 2008).

O efeito da uréia na atividade da protease foi avaliado em diferentes concentrações molares e nota-se que com o aumento progressivo da concentração de uréia houve decréscimo da atividade proteolítica. Na concentração de 1,5 M de uréia a atividade residual da protease foi de 58% e com o aumento da concentração a 5 M observa-se a redução da atividade a 10% da atividade inicial, indicando que a uréia possui efeito desnaturante (**Figura 20**).

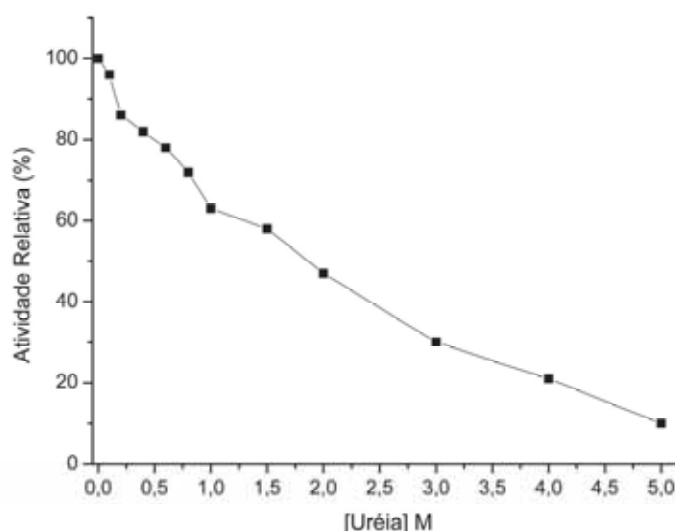


Figura 20. Efeito de uréia na atividade da protease produzida por *A. fumigatus* Fresenius, utilizando substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp

4.4 PARÂMETROS CINÉTICOS DOS SUBSÍTIOS CATALÍTICOS DA PROTEASE PRODUZIDA POR *A. fumigatus* Fresenius

Foram realizados estudos cinéticos investigando a influência da posição P₁, P₂, P₃, P'₁, P'₂, P'₃ na atividade da protease utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Dentre os diversos substratos estudados, observou-se que na posição P₁ o substrato que apresentou maior eficiência catalítica foi com o aminoácido prolina apresentando 363 mM⁻¹.s⁻¹, seguido de glutamina e serina, nesta posição. (**Figura 21**).

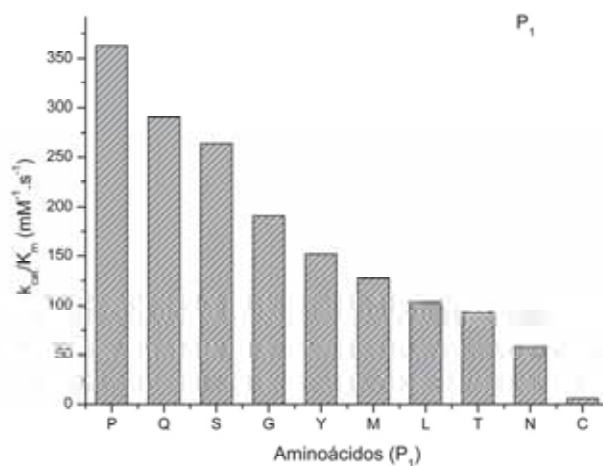


Figura 21. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-KLXSSKQ-EDDnp (P₁)

Ressalta-se que a enzima apresentou maior afinidade por prolina em P₁, diferente dos resultados mostrados em estudo de especificidade da protease produzida por *Thermoascus aurantiacus*. (MERHEB-DINI et al., 2009).

Na posição P₂ os substratos com maiores taxas de hidrólise foram isoleucina, arginina e valina, com 304,3, 250 e 145,4 mM⁻¹.s⁻¹, respectivamente (**Figura 22**). Estes valores foram menores que os picos de eficiência catalítica alcançados pelos melhores substratos em P₁ e P₃. Também foi detectada baixa eficiência catalítica quando testado cisteína nesta posição.

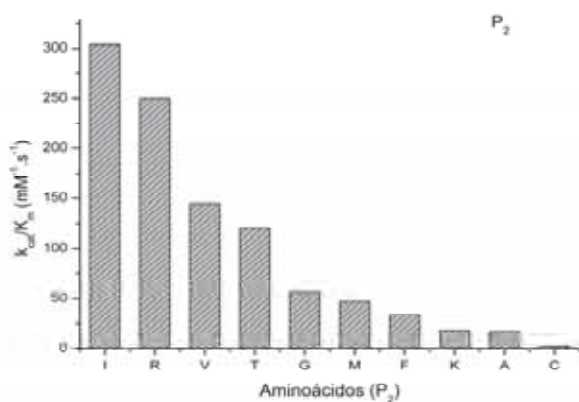


Figura 22. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-KXRSSKQ-EDDnp (P₂)

Em relação à posição P_3 os três melhores substratos foram glicina $307,69 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, alanina $289,47 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ e isoleucina com $266 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Figura 23**).

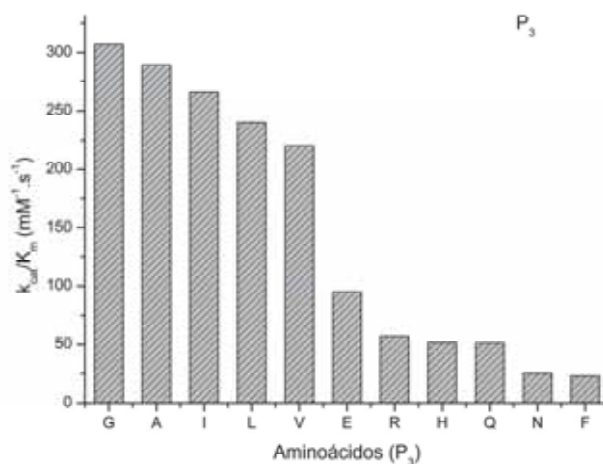


Figura 23. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-XLRSSKQ-EDDnp (P_3)

Observa-se que todos os aminoácidos apolares estudados em P_3 apresentaram eficiência catalítica alta em relação aos aminoácidos de cadeia lateral ácida (ácido glutâmico), cadeia lateral básica (histidina e arginina) e cadeia lateral aminada (asparagina e glutamina), indicando a alta especificidade por aminoácidos apolares em P_3 .

A preferência por resíduos apolares na posição P_3 também foi mostrada em estudo de especificidade catalítica das proteases catépsina B e L e papaína (PORTARO et al., 2000).

Nos estudos das posições P_1' , P_2' e P_3' (**Figuras 24, 25 e 26**) a enzima revelou um comportamento diferente em relação aos valores da eficiência catalítica, sendo que os máximos de eficiência catalítica alcançados foram inferiores aos picos de atividade demonstrados em P_1 , P_2 e P_3 , com exceção da posição P_3' para o substrato contendo leucina nesta posição, cujo valor de eficiência catalítica foi de $1.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Nas posições P_1' , P_2' , P_3' destacam-se valores de maior eficiência catalítica para os substratos contendo asparagina e isoleucina (posição P_1'), asparagina e glutamina (posição P_2') e leucina (posição P_3').

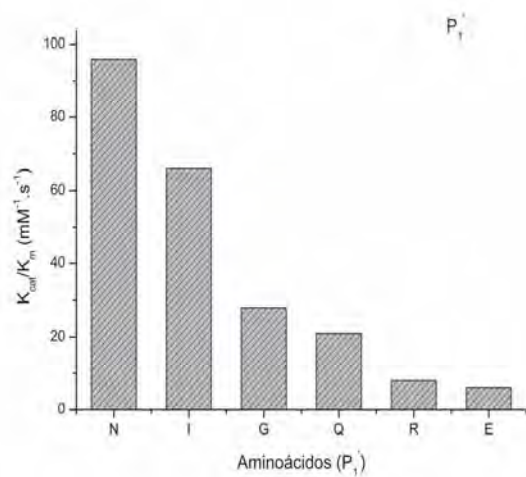


Figura 24. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-KLRXSKQ-EDDnp (P_1')

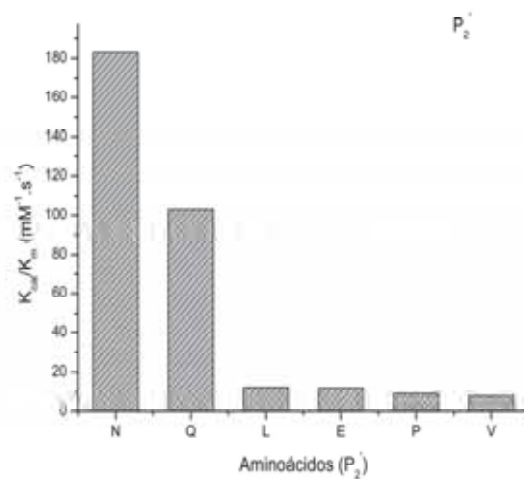


Figura 25. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-KLRXSKQ-EDDnp (P_2')

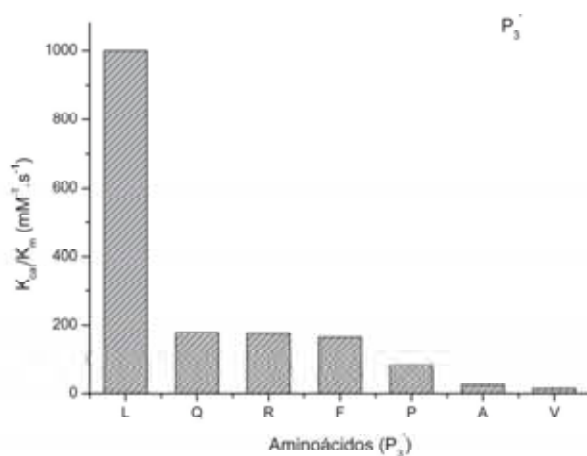


Figura 26. Parâmetros cinéticos para hidrólise da série de peptídeo (FRET) Abz-KLRSSXQ-EDDnp (P_3')

Neste estudo de eficiência catalítica de acordo com as variações de posicionamento de diferentes aminoácidos no substrato, destaca-se a eficiência catalítica para o substrato contendo leucina na posição P_3' , com $1.000 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (**Figura 26**). No entanto também se ressalta a alta eficiência catalítica demonstrada em alguns substratos nas posições P_2 e P_3 , principalmente quanto ao aminoácido valina, o qual também foi estudado nas posições P_2' e P_3' . Com esses resultados pode se inferir que a exceção da leucina na posição P_3' , as posições P_2' e P_3' exercem menor influência na catálise enzimática, visto que P_2 e P_3 apresentaram maiores eficiências catalíticas.

5. CONCLUSÕES

Maior produção de protease em FES, utilizando substrato farelo de trigo (100%) sem suplementação protéica, sendo a produção, aproximadamente 30 vezes superior ao obtido em FSm.

Produção de serino-protease alcalina com massa molar de 33 kDa. Atividade ótima em pH 7,5 e 50°C, com tendência alcalina e maior estabilidade em temperaturas até 50°C, com 30 minutos de incubação. Nos estudos cinéticos observou-se que o subsítio S₃ demonstrou especificidade por aminoácidos apolares e o subsítio S₃' maior especificidade pelo aminoácido Leucina (apolar), também sendo o maior valor k_{cat}/K_m

No entanto, no geral a protease demonstrou ser inespecífica para os substratos estudados nas posições S₁, S₂, S₁' e S₂', indicando que esta enzima apresenta-se de forma necessária para hidrólise de ampla variedade de fontes protéicas pelo fungo *A. fumigatus* Fresenius.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIDI, F.; LIMAN, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay biodetergent. *Process Biochemistry*, v. 43, p. 1202–1208, 2008.
- AGRAWAL, D.; PATIDAR, P.; BANERJEE, T.; PATIL, S. Production of alkaline protease by *Penicillium* sp. under SSF conditions and its application to soy protein hydrolysis. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 977-981, 2004.
- ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. *Bioresource Technology*. v. 64, p.175-183, 1997.
- BAZARZHAPOV, B. B.; LAVRENT'EVA, E. V.; DUNAEVSKII, Ya. E.; BILANENKO, E. N.; NAMSARAEV, B. B. Extracellular proteolytic enzymes of microscopic fungi from thermal springs of the barguzin valley (northern baikal region). *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 42; n° 2; p.186-189, 2006.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. *Bioquímica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- BHASKAR, N.; MODI, V. K.; GOVINDARAJU, K.; RADHA, C.; LALITHA, R. G. Utilization of meat industry by products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 388–394, 2007.
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- BON, E. P. S.; VERMELHO, A. B. Queratinase. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, p. 291-306, 2004.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrate fort tissue and plasma kallikreins. *Analytical Biochemistry*, v. 192, n. 2, p. 419-425, 1991.
- DEMAIN, A. L. The business of biotechnology. *Industrial Biotechnology*, 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, p. 57-81, 1989.
- EL-ENSHASY, H. A. Filamentous fungal cultures – process characteristics, products, and applications. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources*, p. 225-262, 2007.
- FENG, Y. Y.; YANG, W. B.; ONG, S. L.; HU, J. Y.; NG, W. J. Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 57, p. 153-160, 2001.

- FITZGERALD, R. J.; O'CUINN, G. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. *Biotechnology Advances*, v. 24, p. 234-237, 2006.
- GARCIA-CARREÑO, F. L.; DEL TORO, M. N. Classification of proteases without tears. *Biochemical Education*, v. 25, n. 3, p.161-167, 1997.
- GUPTA, R.; BEG, Q. K.; KHAN, 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.
- HAQ, I. U.; MUKHTAR, H.; UMBER, H. Production of Protease by *Penicillium chrysogenum* Through Optimization of Environmental Conditions. *Journal of Agriculture and Social Science*, v. 2, p. 23-25, 2006
- 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.
- 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, 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.
- LARCHER, G.; BOUCHARA, J. P.; ANNAIX, V.; SYMOENS, F.; CHABASSE, D.; TRONCHIN, G. Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* culture filtrate. *FEBS Letters*, v. 308, p. 65–69, 1992.
- LODS, L. M.; DRES, C.; JOHNSON, C.; SCHOLZ, D. B.; BROOKS, G. J. The future of enzymes in cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, n. 22, p. 85-94, 2000.
- MACCHIONE M. M.; MERHEB, C. W.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Protease production by different thermophilic fungi. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 146, p. 223-230, 2008.

- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10 ed. Prentice Hall, 2004.
- MADRUGA, S.; CAMARA, S. The chemical composition of multimistura as a food supplement. *Food Biochemistry*, v. 68, p. 41-44, 2000.
- MALATHI, S.; CHAKRABORTY, R. Production of alkaline protease by a new *Aspergillus flavus* isolated under solid-substrate fermentation conditions for use as a depilation agent. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 57, n. 3, p. 712-716, 1990.
- MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YU, H.; KOLAITUKUDY, P. E. Purification and characterization of an elastinolytic metalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infection and Immunity*, v. 62, p. 2149-2157, 1994.
- MEHTA, V. J.; THUMAR, J. T.; SINGH, S. P. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1650-1654, 2006.
- MERHEB, C. W.; CABRAL, H.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungi *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, v. 104, n. 1, p. 127-131, 2007.
- MERHEB-DINI, C.; CABRAL, H.; LEITE, R. S. R.; ZANPHORLIN, L. M.; OKAMOTO, D. N.; RODRIGUEZ, G. O. B.; 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. 30, n. 20, 2009.
- MEYERS, S. P.; AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. *Mycologia*, v. 69, p. 646-651, 1977.
- MONOD, M.; PARIS, S.; SANGLARD, D.; JATON-OGAY, K.; BILLE, J.; LATGÉ, J. P. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 4099-4104, 1993.
- NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 3, p. 582-588, 2006.
- 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.
- PANDEY, A. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 13, p. 81-84, 2003.
- PORTARO, F. C. V.; SANTOS, A. B. F.; CEZARI, M. H. S.; JULIANO, M. A.; CARMONA, E. Probing the specificity of cysteine proteinases at subsites remote from the active site: analysis of P₄, P₃, P₂, and P₃' variations in extended substrates. *Biochemistry Journal*, v. 347, p. 123-129, 2000.

- 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.
- REICHARD, U.; BÜTTNER, S.; EIFFERT, H.; STAIB, F.; RÜCHEL, R. Purification and characterization of an extracellular serine proteinase from *Aspergillus fumigatus* and its detection in tissue. *Journal of Medical Microbiology*, v. 33, p. 243–251, 1990.
- REICHARD, U.; EIFFERT, H.; RUCHEL, R. Purification and characterization of an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 32, p.427–436, 1994.
- REICHARD, U.; MONOD, M.; RUCHEL, R. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding an extracellular aspartic proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 130, p. 69–74, 1995.
- ROCCO, A. G.; MOLLICA, L.; RICCHIUTO, P.; BAPTISTA, A. M.; GIANAZZA, E.; EBERINI, I. Characterization of the protein unfolding processes induced by urea and temperature. *Biophysical Journal*, v. 94, p. 2241–2251, 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.
- SANTOS, J. A. N. *Inibição e especificidade da Lb_{pro} do vírus da febre aftosa*. 2009. 93f. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes a practical approach*. New York: Oxford University, p. 25-55, 1996.
- 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.
- SELLEK, G. A.; CHAUDHURI, J. B. Biocatalysis in organic media using enzymes from extremophiles. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 25, p. 471-482, 1999.
- SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, v. 297, p. 2275-2279, 2002.
- SHAN, L.; MARTI, T.; SOLLID, L. M.; GRAY, G. M.; KHOSLA, C. Comparative biochemical analysis of three bacterial prolyl endopeptidases: implications for coeliac sprue. *Biochemical Journal*, v. 383, p. 311-318, 2004.

- SIM, Y-C.; LEE, S-G.; LEE, D-C.; KANG, B-Y.; PARK, K-M.; LEE, J-Y.; KIM, M-S.; CHANG, I-S.; RHEE, J-S. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. *Biotechnology Letters*, n. 22, p. 137-140, 2000.
- 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.; SANDHYA, C.; SZAKACS, G.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, v. 43, p. 313-319, 2005.
- TEKAIA, F.; LATGÉ, J. P. *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current Opinion in Microbiology*, v. 8, p. 385-392, 2005.
- TRAN, L. H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 3, p. 1184-1187, 2002.
- TUNGA, R.; SHRIVASTAVA, B.; BANERJEE, R. Purification and characterization of a peptidase from solid state culture of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1553-1558, 2003.
- VAN DEN HOMBERG, J. P. T. W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J. I.; FRAISSINET-TACHET, L.; VISSER, J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology*, v. 15, p. 256-263, 1997.
- VOET, D.; VOET, J. G. *Bioquímica*. 3ªed. Artmed. São Paulo, 2006.
- WANG, S-L.; CHEN, Y-H.; WANG, C-L.; YEN, Y-H.; CHERN, M-K. Purification and characterization of a serine peptidase extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 36, p. 660-665, 2005.
- WU, T.Y.; MOHAMMAD, A. W.; JAHIM, J. M.; ANUAR, N. Investigations on protease production by a wild-type *Aspergillus terreus* strain using diluted retentate of pre-filtered palm oil mill effluent (POME) as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p.1223-1229, 2006.
- ZHU, W.; CHA, D.; CHENG, G.; PENG, Q.; SHEN, P. Purification and Characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology*, n. 40, p. 1592-1597, 2007.