

Andrezza Neves Gonçalves

Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da  
peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*

São José do Rio Preto

2013

Andrezza Neves Gonçalves

Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase  
produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

São José do Rio Preto

2013

Gonçalves, Andrezza Neves.

Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* / Andrezza Neves Gonçalves. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2013.

71f : il. ; 30 cm.

Orientador: Hamilton Cabral

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.

1. Fermentação. 2. Enzimas de fungos. 3. Aplicações industriais. 4. Biotecnologia. 5. *Aspergillus flavus*. 6. Peptidase I. Cabral, Hamilton. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 663.15

Andrezza Neves Gonçalves

Estudos bioquímicos e determinação da especificidade da peptidase  
produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração – Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Banca examinadora

Prof. Dr. Hamilton Cabral

FCFRP/USP-Ribeirão Preto

Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleonora Cano Carmona

IB/UNESP- Rio Claro

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli

FFCLRP/USP- Ribeirão Preto

São José do Rio Preto

22/março/2013

Dedico esse trabalho

A meu filho, Bernardo, por me ensinar a rir nos momentos difíceis e levar a vida de uma forma mais “leve”. A Samantha e Sabrina, onde quer que vocês estejam sempre estarão comigo!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por permitir essa grande VIAGEM!

Ao meu orientador e “parceiro”, Prof. Dr. Hamilton Cabral, por sua compreensão, dedicação e confiança durante toda esta caminhada, obrigada!

À família do laboratório de Tecnologia Enzimática: Ana Claudia (Aninha), Érika (Érika), Gabriel (Gabi), Nathalia (Nath), Ronivaldo (Rony), Tamara (Tatinha), Viviane (Vivi), Youssef (Yourself, Libanês e por aí vai..). Obrigada a todos vocês por nossos momentos de descontração, conversas, piadas, estresse para organizar o “lab”, almoços coletivos, enfim, vocês são muito importantes na minha vida. Agradecimento especial à Nathalia, (Nath) nossa técnica, obrigada por todo apoio técnico, sugestões e colaborações, com toda certeza foram muito importantes!

Aos meus primeiros orientadores, que me ensinaram a dar os primeiros passos na caminhada científica: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Raquel Gerlach, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Enilza Maria Espreafico, Dr. Cleidson Alves e Dr<sup>a</sup> Tatiane Izidoro-Toledo. Obrigada por todo apoio!

À minha banca de qualificação Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleonora Cano Carmon, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Canduri e Prof. Dr. Hamilton Cabral, por todas as sugestões e correções da primeira versão deste manuscrito.

À minha banca de defesa Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eleonora Cano Carmona, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria de Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli e Prof. Dr. Hamilton Cabral, por todas as sugestões e correções da versão final deste manuscrito.

Aos meus pais, Ivanilda e Osmar, sem palavras para agradecer o apoio financeiro, psicológico, a companhia durante minhas viagens para realização dos meus créditos e tudo o que vocês puderam me dar neste pequeno período da minha vida, amo-os mais que tudo!

Aos meus irmãos, Ana Paula e Michel, o que seria de mim sem “nós”?

Ao meu filhote, Bernardo, pela parceria, por me presentear com o amor mais puro e fraternal. Obrigada gatinho, mesmo sem entender e até consentir, “doou” parte do tempo destinada a você para que a mamãe pudesse realizar mais uma “empreitada”.

À minha “mãe” e amiga Inês, só você sabe o quanto te admiro. Obrigada por essa amizade linda, por me ouvir e por seus conselhos sempre muito bem-vindos!

Aos melhores amigos do mundo: Ana Claudia Siqueira, Anna Laura Jacob, Ana Paula Battel, Andrea Marcaccini, Carla Ceron, Emeline Campanini, Elaine Campos, Elen Rizzi, Fernanda Travaini, Glauce Almeida, Isabel Porto, Jéssica dos Santos, Lucas Peres, Maria Laura Pereira, Mariana Lima, Mariana Turolla, Michele de Castro, Rodolfo Gomes, Tamara Ângelo, sem vocês, esse momento *sui generis* da minha vida não teria sido fácil. Obrigada por estarem presentes sempre, no mundo virtual ou real!

À minha mais “nova família”: Sr. Juvenal, Dona Neide, Jess, Jesiane, Neco, Max e Frederico. Nem todos os anjos têm asas! Obrigada por estarem presentes nas nossas vidas!

À Paula Gonçalves (Paulinha) meu ponto de luz. Obrigada por todas as nossas conversas e por 15 anos de amizade, você é única!

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas e ao Programa de Pós-Graduação da Microbiologia. Obrigada por todo apoio.

À coordenadora da pós Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Rahal e sua secretária Lenira Bueno. Ao pessoal da sessão de pós-graduação: Rosemar Rosa de Carvalho Brena, Silvia Emiko Kazama, Silvia Mara Vicentini, Alex Antônio dos Santos e Mauro Kasuo Miasaki e às meninas da biblioteca: Vivian Letícia Duarte Parisi e Cláudia Araújo Martins. Obrigada a todos pelo apoio dado, pessoalmente ou virtualmente.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto e de outros trabalhos do nosso laboratório.

## **Little Wonders**

Let it go, let it roll right off your shoulder don't you know!

The hardest part is over.

Let it in, let your clarity define you in the end we will only just remember how it feels;

Our lives are made in these small hours, these little wonders, these twists and turns  
of fate time falls away,

But these small hours, these small hours still remain

Let it slide, let your troubles fall behind you

Let it shine until you feel it all around you and i don't mind

if it's me you need to turn to

We'll get by, it's the heart that really matters in the end

Our lives are made in these small hours, these little wonders, these twists and turns  
of fate time falls away,

But these small hours, these small hours still remain

All of my regret will wash away somehow but i cannot forget

The way i feel right now!

In these small hours, these little wonders, these twists and turns of fate

These twists and turns of fate

Time falls away but these small hours these small hours, still remain,

Still remain

These little wonders, these twists and turns of fate time falls away but these small  
hours

These little wonders still remain

**Rob Thomas**

***From Walt Disney Pictures "Meet the Robinsons"***

## RESUMO

Há um grande interesse no mercado de enzimas para descobertas de novas fontes para prospecção, tendo em vista que as enzimas de origem animal ou vegetal não suprem totalmente a demanda mundial. Desta forma busca-se não apenas novas fontes, mas também materiais fermentescíveis de baixo custo, assim agregando valor ao produto final. Neste trabalho investigou-se a produção de peptidase utilizando o fungo *Aspergillus flavus*, através de dois processos biofermentativos, sólido e submerso, usando farelo de trigo e meio complexo, respectivamente. Alguns parâmetros foram analisados para a obtenção de uma melhor produção. Para o bioprocessamento fermentativo sólido foi investigada a influência da concentração de esporos, suplementação do meio com fontes adicionais de nitrogênio, temperatura e tempo. Obtivemos para essas variações as melhores condições quando o fungo era fermentado somente em farelo de trigo, sem suplementação de fontes adicionais de nitrogênio, com a proporção de  $2,5 \times 10^6$  esporos/ 5g meio a 30°C e em 96 horas de fermentação. Para o bioprocessamento fermentativo submerso avaliamos a influência da concentração de esporos, suplementação do meio com fontes de carbono e com caseína, temperatura, pH e tempo. Obtivemos como melhores condições quando o fungo era fermentado em meio sem suplementação de fonte de carbono adicional, com 0,5% de caseína,  $5 \times 10^5$  esporos/mL de meio a 30°C em pH 8 por 168 horas. Os extratos enzimáticos de ambos os bioprocessos foram caracterizados bioquimicamente avaliando desta forma: pH ótimo, temperatura ótima e classe da peptidase. A partir desses dados foram realizados métodos cromatográficos para obtenção da peptidase pura e com essa amostra realizou-se a caracterização bioquímica funcional e a determinação dos parâmetros cinéticos, ambos utilizando o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência. O fungo *Aspergillus flavus* mostrou ser um bom produtor de peptidases sendo pouco exigente na etapa de produção. A peptidase utilizada nos processos cromatográficos foi a proveniente do bioprocessamento fermentativo sólido, onde obtivemos maior rendimento. O processo de purificação mostrou-se viável e reproduzível, com recuperação de 17% e purificação de 248,2 vezes. A peptidase produzida pertence à classe das serino peptidases, apresentando atividade catalítica ótima no pH 6,5 e na temperatura de 35°C, além de apresentar estabilidade em pH mais alcalino, mantendo uma grande estabilidade até 50°C. A peptidase apresentou grande estabilidade frente à exposição a concentrações crescentes de NaCl, surfactantes, ureia e DTT, demonstrando assim uma estabilidade estrutural. A peptidase purificada não foi ativada por nenhum íon testado, apresentando inibição significativa na presença do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , inibição que se mostrou reversível em 50%. A análise dos parâmetros cinéticos revelou uma grande influência do lado "linha" da peptidase na eficiência catalítica tendo uma especificidade no subsítio  $\text{P}_2$  para aminoácidos apolares.

Palavras chave: Peptidase, Bioprocessamento, *Aspergillus flavus*, Biotecnologia.

## ABSTRACT

*There is a great interest by enzyme's market on discovery of new sources for prospecting, considering that the enzymes from animal or plant do not fully supply the global demand. Therefore, the research of new sources, is not only of new sources, but also fermentable material with low cost are also required, in order to add value to the final product. In this study it was investigated the production of peptidase using the fungus Aspergillus flavus, through two processes, solid and submerged fermentation, using wheat bran and complex media, respectively. Some parameters were analyzed to obtain the best production. In solid fermentation bioprocess were investigated the influence of spore concentration of supplementation of the medium with additional sources of nitrogen, temperature and time. We obtained for these variations the best conditions when the fungus was fermented wheat bran only, without supplementation of additional sources of nitrogen, with a density of  $2.5 \times 10^6$  spores / 5 g medium at 30 ° C and 96 hours of fermentation. In the submerged fermentation bioprocess were evaluated the effect of spore concentration supplementation of the medium with carbon sources and with casein, temperature, pH and time. We obtained as best conditions when the fungus was fermented in medium without supplemental carbon source added with 0.5% casein,  $5 \times 10^5$  spores / ml medium at 30°C at pH 8 for 168 hours. The enzymatic extracts obtained by these bioprocesses were biochemically characterized by testing optimum pH, optimum temperature and class of peptidase. From these data it was obtained a pure peptidase by using chromatographic methods and this sample was used for functional biochemical characterization and determination of kinetic parameters, using the peptide substrate of FRET. The fungus Aspergillus flavus proved to be a good producer of peptidases being undemanding in the production stage. The peptidase used in chromatographic processes was derived from solid fermentation bioprocess, on which it was achieved higher yield. The purification process was feasible and reproducible, with 17% recovery and purification of 248.2 fold. The peptidase produced belongs to the class of serine peptidases, presenting optimum catalytic activity at pH 6.5 and 35°C, showing more stability at alkaline pH and maintained stable up to 50°C. The peptidase showed stability against exposure to increasing concentrations of NaCl, DTT, urea and surfactants, thus demonstrating structural stability. The purified peptidase was not activated by any ion tested, showing significant inhibition in presence of  $\text{Cu}^{2+}$  ion, which showed reversible inhibition by 50%. Analysis of kinetic parameters revealed a major influence on the "line" side of the peptidase catalytic efficiency and specificity at the  $P_2$  subsite to nonpolar amino acids.*

*Keywords: Peptidase, Bioprocess, Aspergillus flavus, Biotechnology*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Representação de um polipeptídeo interagindo com o sítio ativo de uma metalo peptidase, representando o modelo proposto por Schechter e Berger. 11
- Figura 2.** Representação do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência apresentando os grupos emissor e supressor de fluorescência. 12
- Figura 3.** Fluxograma das etapas realizadas para produção de peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*. 16
- Figura 4.** Influência da suplementação do resíduo agroindustrial, farelo de trigo (FT) com: (A) caseína e (B) ovoalbumina, como fonte de nitrogênio. 30
- Figura 5.** Influência da concentração de inoculo para produção de peptidase 31
- Figura. 6.** Influência da temperatura para produção de peptidase 32
- Figura. 7.** Influência da suplementação do meio no BFSm com três fontes de carboidratos diferentes nas porcentagens: (A) 0,1%, (B) 0,5% e C (1%) para produção de peptidase 33
- Figura 8.** Influência da suplementação do meio no BFSm com caseína nas proporções de: 0,25; 0,5 e 1% na produção de peptidase. 35
- Figura 9.** Influência da concentração de esporos no BFSm nas concentrações  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$ , para produção de peptidase. 36
- Figura 10.** Influência do pH inicial no BFSm, para produção de peptidase. 37
- Figura 11.** Influência da variação de temperatura no BFSm, para produção de peptidase . 38
- Figura 12.** Determinação do pH ótimo da peptidase presente no extrato enzimático proveniente do BFs e BFSm. 39
- Figura 13.** Determinação da temperatura ótima da peptidase presente no extrato enzimático provenientes do BFs e BFSm. 40
- Figura 14.** Perfil cromatográfico da eluição das proteínas, utilizando a resina Sephacryl S-100. 42
- Figura 15.** Perfil cromatográfico da eluição das proteínas provenientes da 43

troca iônica, utilizando a resina Source Q.

- Figura 16.** Gel desnaturante SDS-PAGE 12% da amostra pura 43
- Figura 17.** Zimograma co-polimerizado com gelatina para detecção de atividade gelatinolítica das peptidases presentes nos extratos enzimáticos. 44
- Figura 18.** (A) Influência dos diferentes valores de pH sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada. (B) Estabilidade da peptidase purificada, frente à exposição a diferentes valores de pH. 45
- Figura 19.** (A) Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada. (B) Estabilidade da peptidase purificada, frente à exposição a diferentes temperaturas. 46
- Figura 20.** Efeito do DTT sobre a ativação da peptidase inativada por  $\text{Cu}^{2+}$ . 48
- Figura 21.** Efeito dos surfactantes CTAB, Tween 20<sup>®</sup> e SDS sobre a atividade proteolítica de peptidase. 49
- Figura 22.** Efeito da ureia sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada. 50
- Figura 23.** Efeito do NaCl sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada. 50
- Figura 24.** Efeito do DTT sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada. 51
- Figura 25.** Representação da eficiência catalítica observada no lado não linha: (A)  $P_1$ ; (B)  $P_2$  (C)  $P_3$ . 52
- Figura 26.** Representação da eficiência catalítica observada no lado linha: (A)  $P_1$ ; (B)  $P_2$  (C)  $P_3$ . 53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Influência de inibidores sobre a atividade das peptidases presente nos extratos enzimáticos do BFSm e BFs.	42
<b>Tabela 2.</b> Etapas de purificação da peptidase	42
<b>Tabela 3.</b> Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada utilizando substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.	47
<b>Tabela 4.</b> Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica da peptidase purificada utilizando substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp.	48
<b>Tabela 5.</b> Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada para os subsítios $S_1$ , $S_2$ e $S_3$ utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições nas posições $P_1$ , $P_2$ , e $P_3$ .	69
<b>Tabela 6.</b> Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada para os subsítios $S'_1$ , $S'_2$ e $S'_3$ utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições nas posições $P'_1$ , $P'_2$ , e $P'_3$ .	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A/Ala	Alanina
Abz	Ácido orto-aminobenzóico
BFs	Bioprocesso fermentativo em estado sólido
BFSm	Bioprocesso fermentativo em estado submerso
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DTT	Ditiotreitol
E/Glu	Ácido glutâmico
E-64	<i>transepoxy succinyl-L-leucylamido 4-guanidino butane</i>
EDDnp	N-(2,4- dinitrofenil)-etilenodiamino
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EE	Extrato enzimático
EF	Extrato fermentado
F/Phe	Fenilalanina
FRET	Transferência de energia entre dois fluoróforos
FT	Farelo de trigo
G/Gly	Glicina
GL	<i>Gay Lussac</i>
H/His	Histidina
I/Ile	Isoleucina
K/Lys	Lisina
$k_{cat}$	Constante catalítica
$K_M$	Constante de <i>Michaelis-Menten</i>
$k_{cat}/K_M$	Eficiência catalítica
L/Leu	Leucina
M/Met	Metionina

P/Pro	Prolina
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
PMSF	Fluoreto de fenil-metil sulfonila
Q/Gln	Glutamina
R/Arg	Arginina
S/Ser	Serina
TA	Temperatura Ambiente
TCA	Ácido tricloroacético
Tween 20 <sup>®</sup>	Polissorbato 20
V/Val	Valina
V <sub>max</sub>	Velocidade máxima
W/Trp	Triptofano
Y/Tyr	Tirosina

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	i
<b>Abstract</b>	ii
<b>Lista de ilustrações</b>	iii
<b>Lista de tabelas</b>	v
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b>	vi
<b>Sumário</b>	viii
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2. OBJETIVOS</b>	13
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	15
3.1 Fluxograma.	16
3.2 Microrganismo e manutenção.	17
3.3 Bioprocesso Fermentativo.	17
3.3.1 Bioprocesso Fermentativo em estado sólido (BFs).	17
3.3.2 Bioprocesso Fermentativo em estado submerso (BFSm).	18
3.4 Avaliação da atividade proteolítica utilizando caseína como substrato.	19
3.5 Precipitação por etanol e filtração tangencial.	20
3.6 Caracterização bioquímica do extrato enzimático do BFs e BFSm utilizando como substrato azocaseína.	20
3.7 Purificação.	22
3.7.1 Cromatografia de exclusão de massa molecular e troca iônica.	22
3.8 Avaliação do grau de pureza e estimativa da massa molecular e atividade gelatinolítica da peptidase purificada.	23
3.9 Ensaio de caracterização bioquímica funcional e cinética enzimática.	23
3.9.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência Abz-KLRSSKQ-EDDnp (FRET).	23
3.9.2 Condições para o ensaio de caracterização bioquímica funcional e	

cinética utilizando substratos FRET.	24
3.9.3 Efeito do pH e temperatura.	24
3.9.4 Efeito de íons e inibidores.	25
3.9.5 Efeito de surfactantes e agentes redutores.	25
3.9.6 Reversão da inativação da peptidase utilizando agente redutor DTT.	26
3.9.7 Determinação do efeito do NaCl na atividade catalítica.	26
3.10 Estudos de cinética enzimática.	26
3.10.1 Determinação da concentração molar da peptidase purificada.	26
3.10.2 Ensaio cinético com substrato sintético com supressão intramolecular de fluorescência.	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
4.1 Bioprocesso fermentativo em estado sólido (BFs).	29
4.2 Bioprocesso fermentativo em estado submerso (BFSm).	32
4.3 Caracterização Bioquímica dos EE obtidos no BFSm e BFs utilizando substrato azocaseína.	38
4.4 Purificação.	41
4.5 Caracterização bioquímica funcional.	44
4.6 Estudos de cinética enzimática.	51
<b>5. CONCLUSÕES</b>	<b>55</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>58</b>
<b>7. APÊNDICES</b>	<b>67</b>

## ***INTRODUÇÃO***

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Peptidases

As peptidases são enzimas pertencentes à família das hidrolases, que tem como função principal a hidrólise de ligações peptídicas na presença de moléculas de água (PARANTHAMAN; ALAGUSUNDARAM; INDHUMATHI, 2009). Representam um dos maiores grupos de enzima industrial com uma demanda crescente devido suas aplicações no campo da pesquisa básica, clínica, indústria e biotecnologia (SANDHYA et al., 2005.a; RAO et al., 1998). Representam aproximadamente 2% de toda proteína expressa nos organismos sendo cerca de 500 genes envolvidos na expressão de peptidase nos seres humanos (Polgár, 2005).

Por serem fisiologicamente necessárias para a vida, as peptidases são onipresentes, sendo encontrada em diversas fontes, tais como: animal, vegetal e microbiana (RAO et al., 1998; KASANA; SALWAN; YADAV, 2011; GONZÁLEZ-RÁBADE et al., 2011). Entretanto, devido às suas características bioquímicas, ampla diversidade e sua susceptibilidade à manipulação genética, os microrganismos são os mais indicados como fonte para produção de peptidases (SANDHYA et al., 2005.a; RAO et al., 1998).

Na área comercial representam cerca de 60% das vendas mundiais de enzimas e possui uma variedade de funções. (RAO et al., 1998).

Classificadas em ácidas, neutras ou alcalinas, dependendo da faixa de pH onde apresentam atividade ideal, são utilizadas pela indústria de detergentes, de couro e medicamentos (VISHWANATHA; RAO; SINGH 2010; RAI; MUKHERJEE, 2011) além de serem utilizadas em processos de biorremediação (GUPTA et al., 2002).

Também podem ser divididas em endopeptidases e exopeptidases, de acordo com o local de clivagem da ligação peptídica. As endopeptidases atuam preferencialmente em regiões mais internas da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases atuam nas proximidades amino-terminal ou carboxi-terminal dessas cadeias (RAO et al., 1998).

Outra maneira de classificação das peptidases é pelo resíduo de aminoácido presente no sítio ativo, que é responsável pelo mecanismo catalítico da enzima.

A base de dados MEROPS *database* é um banco de dados onde é possível obter informações sobre peptidases que estão organizadas em espécies, famílias e clãs. Seu foco é distinguir peptidases através de sua especificidade, de acordo com a sequência que ela cliva. Segundo MEROPS *database* as sete classes principais desse modelo de classificação são: serino peptidases, metalo peptidases, aspartil peptidases, glutamil peptidases, cisteíno peptidases, asparagina peptidase e treonino peptidases. Foram descritas também mais duas classes definidas como peptidases com mecanismo catalítico desconhecido e misto (Rawlings; Barret, 2012).

As serino peptidases constituem o maior grupo dentre as peptidases, sendo encontradas em vírus, bactérias e eucariotos. Em relação ao local de clivagem podemos encontrar nesse grupo: exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases, e peptidases ômega (Rawlings; Barret, 1994).

As serino peptidases, participam de vários processos fisiológicos importantes como: digestão, coagulação sanguínea, resposta imune e reprodução. A primeira serino peptidase que teve seu mecanismo de ação bem caracterizado foi a quimotripsina, por Bender e colaboradores em 1960. Por muito tempo apenas dois grupos de serino peptidases eram conhecidas, mas com advento da biologia molecular, novos grupos foram descobertos. Em comum todas as serinos peptidases apresentam em seu sítio ativo o resíduo do aminoácido Ser, sabe-se que a tríade catalítica clássica é composta por resíduos de Ser-His-Asp, no entanto encontramos outros clãs formados por tríades distintas como as carboxil serino peptidases Asp-Glu-Ser e a Ser-His-His (Polgár, 2005).

As metalo peptidases são um grupo diferenciado de peptidase, pois para sua ativação necessitam da presença de um íon metálico bivalente. Incluem enzimas de várias origens, tais como colagenases de organismos superiores, toxinas hemorrágicas de venenos de serpente, e termolisina de origem bacteriana.

Cerca de 30 famílias já foram descritas dos quais 17 contêm apenas endopeptidases, 12 contêm apenas exopeptidases, e uma contém ambos os endo e

exopeptidases. Famílias de metalo peptidases foram agrupadas em clãs diferentes com base na natureza do resíduo de aminoácido que faz a ligação com o íon divalente no sítio ativo (RAO, 1998).

Aspártico peptidase ou aspartil peptidase, comumente denominada como peptidase ácida, são as endopeptidases que possuem em seu sítio ativo resíduos de ácido aspártico, que está situado dentro do motivo Asp-Gly-Xaa, em que Xaa pode ser resíduo de Ser ou Thr. São agrupadas em três famílias: pepsina, retropepsina e as enzimas de pararetrovírus. Essas peptidases são inibidas por pepstatina (RAO, 1998).

Glutamil ou glutâmica peptidase foi descoberta em 2004 e possui apenas duas famílias descritas. Amplamente distribuída na natureza, desde o grupo das Archae até mamíferos. A estrutura cristalina da primeira enzima descoberta revelou uma díade no sítio catalítico que consiste em dois resíduos, um de Gln53 e outro de Glu136. Com base nestas características únicas, esta enzima fundou a sexta família de peptidases (ODA, 2012).

As cisteíno peptidases ocorrem tanto em procaríoto quanto eucaríoto, 20 famílias já foram descritas. A ação catalítica das cisteíno peptidases depende de uma díade catalítica consistindo de um resíduo de cisteíno e de um resíduo de histidina. Geralmente as cisteíno peptidases são ativadas apenas na presença de agentes redutores tais como HCN ou Cisteína, tendo seu pH ótimo próximo ao neutro (RAO, 1998).

Asparagina peptidase clivam a si próprias em uma ligação asparaginil, e a asparagina é o nucleófilo (MEROPS, 2013).

A descoberta do quinto mecanismo catalítico, a treonino peptidase, foi através da cristalografia do proteossoma eucariótico de *Saccharomyces cerevisiae* determinada por Lowe e colaboradores em 1995 que mostra o resíduo do aminoácido treonina no N-terminal do sítio ativo (MEROPS, 2013).

## 1.2 Peptidases e suas aplicações

Microrganismos vêm desempenhando um papel importante na produção de alimentos (produtos lácteos, carne etc). Além disso, diversos produtos são oriundos de bioprocessos sendo incorporados em alimentos, como aditivos ou suplemento (sabores, corantes, conservantes e adoçantes) (COUTO; SANROMÁN, 2006).

As peptidases microbianas desempenham um papel específico de catalisador na hidrólise de proteínas e são certamente um dos grupos mais importantes de enzimas industriais especialmente as peptidases alcalinas, que são amplamente utilizadas em detergentes, produtos de processamento de couro, recuperação de prata, fins médicos, processamento de alimentos, na indústria química, bem como o tratamento de resíduos (WU et al., 2006).

As peptidases neutras são importantes para a indústria de alimentos, pois são usadas para diminuir o sabor amargo dos hidrolisados proteicos (SANDHYA et al., 2005).

Na produção de detergentes, as peptidases 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).

As enzimas aplicadas à indústria farmacêutica possuem duas características que as distinguem das demais drogas utilizadas: a ação das enzimas sobre seus alvos, pois agem sobre estes com grande afinidade e especificidade; e conversão de múltiplas moléculas alvos em seus produtos desejados. Estas duas características mostram que, enzimas específicas são potentes drogas podendo ser utilizadas em terapias enzimáticas, resultando na utilização destas como drogas para uma ampla variedade de enfermidades (VELLARD, 2003).

As prolil endopeptidases ou prolil oligopeptidases pertencentes à classe das serino peptidases, 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. Elas não são importantes somente em processos fisiológicos, mas também possuem considerável interesse em aplicações bioquímicas e clínicas, por exemplo, no caso da diarreia celíaca ou enteropatia sensível ao glúten. Peptidases específicas em hidrolisar resíduos de prolina são chaves terapêuticas para esta doença do sistema digestivo (SHAN, 2002).

A utilização de enzimas para renovação celular vem causando uma revolução na cosmetologia, originando a chamada enzimocosmética. As enzimas são consideradas um princípio ativo muito importante em produtos cosméticos, onde encontra-se peptidases que hidrolisam ligações peptídicas de colágeno e queratina do *estratum* córneo da pele (YOUNG-CHUL et al., 2000). Esses produtos são utilizados para remoção de manchas e quelóides, além do tratamento de queimaduras e úlceras, e em outras finalidades científicas (SUKHOSYROVA et al., 2003).

Enzimas como a papaína, bromelina e outras peptidases têm sido utilizadas para uniformização e *peeling* dérmico. As ações das peptidases estão relacionadas com a renovação celular, exercendo atividade queratinolítica, removendo as células mortas presentes na epiderme, levando a restauração da mesma (LODS, 2000).

Como uma família de enzimas, as aspartil peptidase ou peptidase ácidas são relativamente um grupo pequeno, que tem recebido grande atenção devida seu papel importante em doenças humanas tais como no tratamento da hipertensão, doença de Alzheimer e em infecções como a candidíase (DASH et al., 2003).

### **1.3 Bioprocessos**

Peptidases de origem microbianas são produzidas por bioprocessos fermentativos.

Esses processos são definidos como um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios, a esterilização (quando o processo demandar) e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação desse (s) produto(s) (PEREIRA JR; BON; FERRARA,2008).

Cada bioprocesso possui características que podem torná-lo vantajoso ou não, dependendo da finalidade.

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que, por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de peptidases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos mesmos. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos produtivos (JOO;CHANG, 2005).

O bioprocesso fermentativo submerso (BFSm) tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis (MARTINS et al., 2002). Esse tipo de sistema de produção de peptidases pode ser realizado em frascos agitados, como erlenmeyer, por exemplo, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial.

De uma forma geral o Bioprocesso Fermentativo submerso (BFSm) possui a vantagem de um maior controle dos parâmetros fermentativos e maior eficiência de absorção de nutrientes e excreção de metabólitos pela célula microbiana (SINHA, SINHA, 2009), e as desvantagens estão relacionadas ao maior custo energético e hídrico, com altos custos em aeração e agitação (BON; FERRARA; CORVO, 2008).

Fatores ambientais, tais como temperatura, pH, níveis de oxigênio, concentrações de nutrientes e produtos afetam significativamente o crescimento fúngico e sua biossíntese.

Culturas realizadas em frascos agitados, por exemplo, erlenmeyer, têm controle ambiental relativamente simples, por apresentarem homogeneidade da suspensão de células, nutrientes e produtos em fase líquida (MOO-YOUNG; MORIERA; TENGEDY, 1983), entretanto apresentam dificuldades no controle de certos parâmetros, como por exemplo, a aeração, que é uma variável determinante em alguns casos de produção de peptidases (ALONSO, 2001). Para agitadores de bancada como, por exemplo, fermentadores, todos os parâmetros são controláveis.

A fermentação submersa para produção de peptidases é comumente executada em *shaker* em escala laboratorial. (CIAFARDINI; ZULLO; IRIDE, 2006).

A composição dos meios de fermentação deve ser otimizada para que haja equilíbrio entre os vários substratos utilizados, assim minimizando a quantidade de componentes não consumidos ao final do processo. O custo efetivo do meio é um fator importante a ser monitorado durante o desenvolvimento da produção, e pode ser reduzido utilizando resíduos agroindustriais disponíveis, tais como o farelo do trigo, o farelo de arroz, óleo vegetal etc. (SANDHYA; MADHAVAN NAMPOOTHIRI; PANDEY, 2005. a).

Peptidases podem ser produzidas por bioprocessos fermentativos, sólido ou submerso, sendo que cada microrganismo ou linhagem apresenta condições particulares para a máxima produção de enzimas (SANDHYA et al., 2005b).

O Bioprocesso Fermentativo sólido (BFs) é definido como qualquer processo de fermentação realizada sobre um material não solúvel que atua tanto como o suporte físico quanto fonte de nutriente, desta forma, ocorrendo ausência de água livre, sendo necessário que o substrato esteja umedecido o suficiente para suportar o crescimento e metabolismo microbiano (PANDEY, 1992). Segundo Aguilar et al. (2008), no BFs os meios de cultura utilizados são simples, podendo ou não serem enriquecidos com nutrientes. O produto formado é concentrado o que facilita a etapa de purificação e a superfície sólida do meio é o ambiente natural do microrganismo.

Entretanto o BFs possui a desvantagem da falta de controle de alguns parâmetros, como: umidade, oxigenação, pH e temperatura, além de ser um bioprocesso limitado àqueles que crescem somente em ambientes com reduzida umidade (COUTO; SANROMÁN, 2006).

#### **1.4 *Aspergillus flavus***

Comparando com outros grupos de organismos vivos, os microrganismos apresentam grande capacidade adaptativa colonizando ambientes nos quais outras formas de vida não seriam viáveis (GOMES et al., 2007).

Os fungos têm sido amplamente utilizados como produtores de diferentes substâncias de interesse econômico, tais como enzimas, antibióticos dentre outros produtos, e os fungos filamentosos são amplamente explorado devido à sua capacidade de crescer e produzir uma vasta gama de enzimas extracelulares (ABIDI et al., 2008).

São microrganismos tipicamente saprófitos, que secretam uma grande variedade de enzimas envolvidas na decomposição e reciclagem de biopolímeros complexos de ambos os tecidos, vegetais e animais. A maioria destas enzimas são hidrolíticas e desempenham um papel importante na nutrição dos fungos.

Alguns microrganismos produzem baixa quantidade de enzimas dificultando sua aplicação industrial. Na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimização, é possível um aumento significativo do rendimento enzimático (KUMAR ; TAKAGI, 1999).

Os dois maiores grupos de microrganismos utilizados em bioprocessos são fungos e bactérias.

Entretanto, os fungos são capazes de secretar metabólitos para o meio extracelular não sendo necessário o rompimento da célula e a separação das proteínas intracelulares (SUKHOSYROVA et al., 2003), processo geralmente caro e dispendioso, o que é uma vantagem para o processo de purificação (SHARMA et al., 2009).

O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Hyphomycetos que se caracterizam pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídios com forma e arquitetura variável (PEREIRA; CARVALHO; PRADO, 2002).

Descrito pela primeira vez por Link em 1809, o *A. flavus* é responsável, assim como *A. fumigatus*, pela aspergilose humana causando também doenças em culturas economicamente importantes, tais como, milho e amendoim, através de micotoxinas potente, como a aflatoxina B1 (HEDAYATI et al., 2007), no entanto, *A. flavus* produz outros metabólitos secundários importantes, que podem se explorados pelas indústrias farmacêuticas.

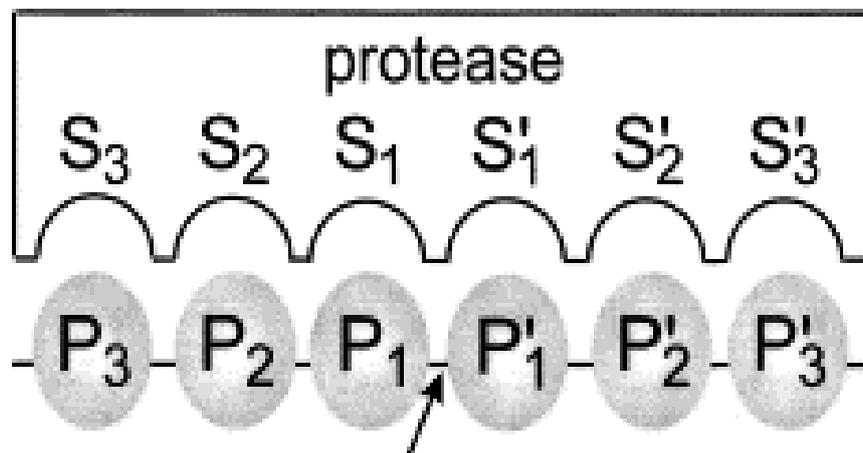
Além da aplicação na medicina o fungo *A. flavus* é capaz de degradar numerosos polímeros orgânicos, sendo considerado como um bom reciclador da biosfera. Possui uma distribuição homogênea nas áreas tropicais e subtropicais do globo, é também um fungo patogênico oportunista não seletivo, tendo sido isolado de insetos, aves, plantas e mamíferos. Devido ao amplo espectro de atuação suas peptidases têm sido estudadas em função das possíveis aplicações na medicina, devido à atividade elastinolítica e colagenolítica, apresentada por algumas delas (MELLON; COTTY; DOWD, 2007).

A grande informação sobre o genoma de várias outras espécies como, *A. fumigatus*, *Neosartoria ficheri* (Anamorfo *A. fisheri*), *A. oryzae*, *A. nidulans* e *A. niger*, torna possível a utilização da genômica comparativa em estudo de biologia básica (CLEVELAND et al, 2009).

As peptidases microbianas do gênero *Aspergillus*, em particular, têm sido estudadas em detalhe, uma vez que esse gênero é conhecido por sua capacidade de secretar altos níveis de enzimas no seu ambiente de crescimento (WU et al., 2006). Desta forma, essas habilidades tornam o fungo *Aspergillus flavus* um bom alvo para prospecção de novos produtos (CLEVELEND et al., 2009).

## 1.5 Mapeamento dos subsítios

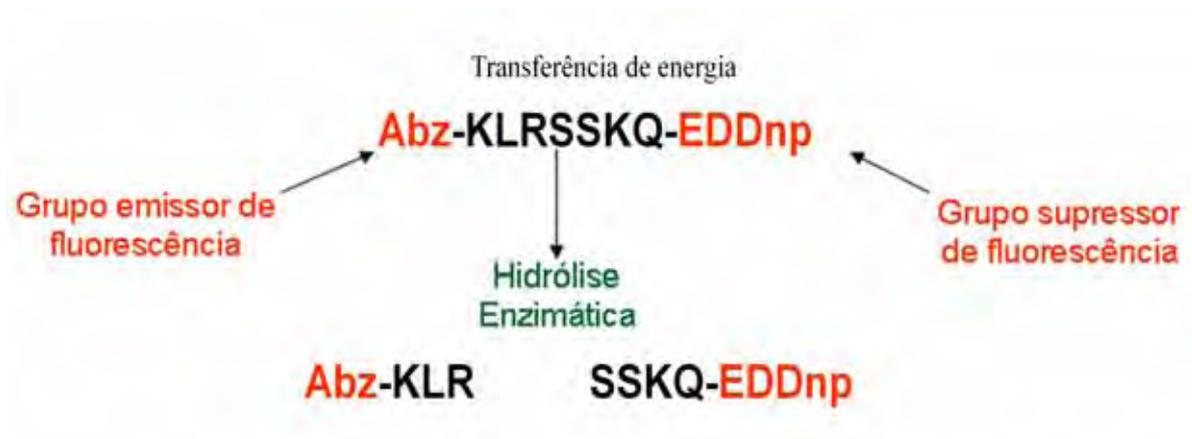
A nomenclatura dos subsítios do sítio catalítico das peptidases foi proposta por Schechter e Berger (1967). Segundo esse modelo, os resíduos de aminoácidos do polipeptídeo na porção N-terminal da ligação peptídica são enumerados de acordo com sua posição na cadeia, sendo denominados  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$  e assim por diante, já os localizados na posição C-terminal são enumerados como  $P'_1$ ,  $P'_2$ ,  $P'_3$ , e assim por diante, desta forma existindo uma correspondência de subsítios na peptidase denominados como  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  e  $S'_1$ ,  $S'_2$  e  $S'_3$  como representado na **Figura 1**.



**Figura 1.** Representação de um polipeptídeo interagindo com o sítio ativo de uma peptidase, representando o modelo proposto por Schechter e Berger. Modificado de GRAHN et al, (1999). A letra S representa resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da peptidase e a letra P resíduos de aminoácidos presentes na cadeia polipeptídica. No sentido N-terminal  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  e C-terminal  $P'_1$ ,  $P'_2$ ,  $P'_3$ .

O mapeamento do sítio catalítico é realizado com substratos peptídicos sintéticos que possuem em sua estrutura aminoácidos que sofrem substituições nas posições de interesse. O substrato com supressão intramolecular de fluorescência apresenta na região amino-terminal um grupo químico que responde pela fluorescência da molécula, o 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 íntegro, o grupo EDDnp promove a supressão da região Abz apresentando assim baixa fluorescência. Quando hidrolisado a separação e o distanciamento entre os grupos EDDnp e Abz permite que ocorra aumento da fluorescência (SANTOS, 2009)



**Figura 2.** Representação do substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência apresentando os grupos emissor e supressor de fluorescência quando não hidrolisado (íntegro) e hidrolisado por ação enzimática (SILVA, 2011). K=lisina; L=leucina; R= arginina; S= serina;Q= glutamina.

## **OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

---

### Objetivo geral:

O objetivo geral deste trabalho foi estabelecer parâmetros dos bioprocessos fermentativo sólido e submerso para produção da peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus* e a caracterização bioquímica funcional da peptidase produzida no bioprocessamento fermentativo de maior rendimento.

### Objetivos específicos:

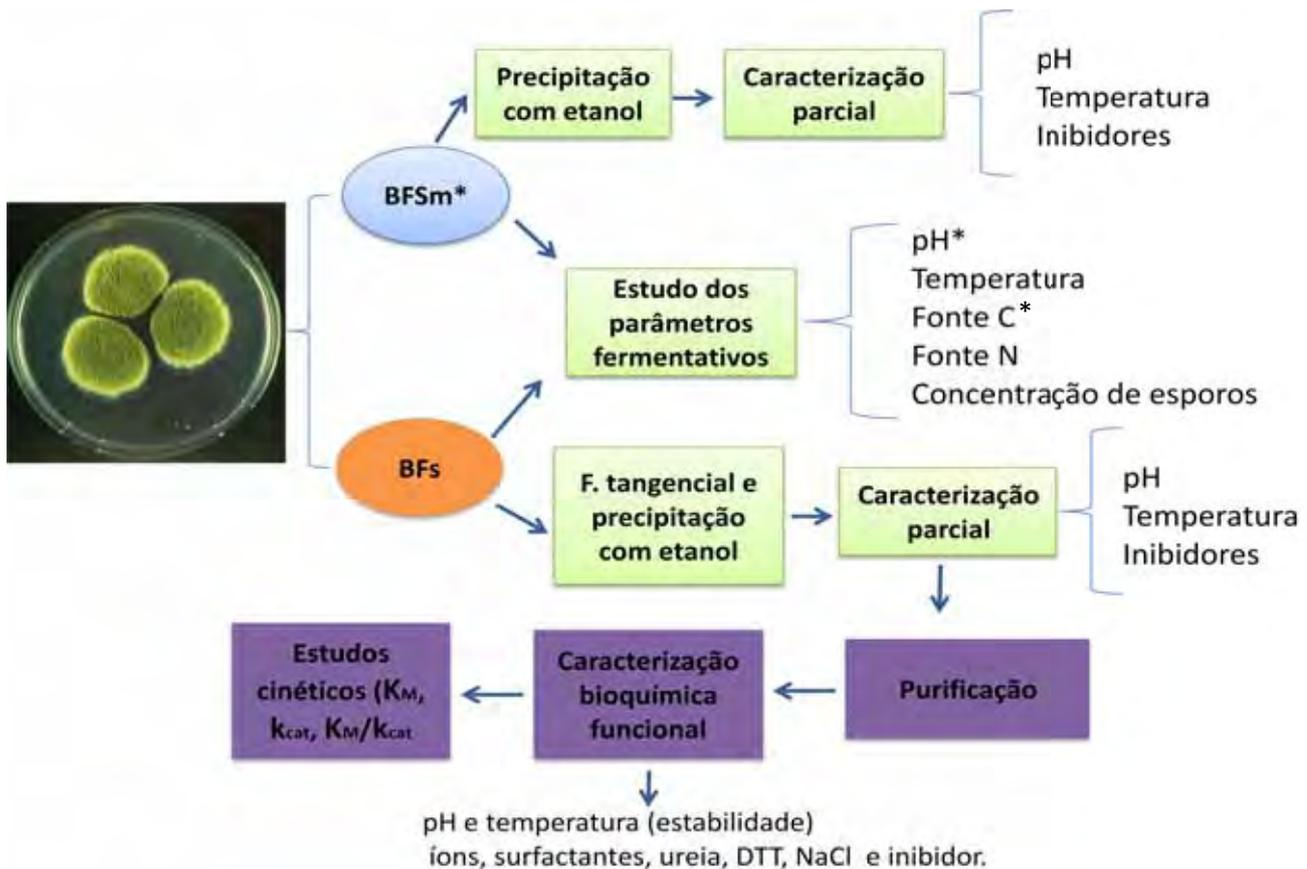
- Investigar o potencial do fungo *Aspergillus flavus* para produção pelo bioprocessamento fermentativo sólido e submerso, utilizando como meio de cultura, farelo de trigo e meio complexo, respectivamente determinando os melhores parâmetros fermentativos;
- Realizar a purificação do(s) produto(s) obtido no bioprocessamento fermentativo de maior rendimento;
- Realizar a caracterização bioquímica da(s) peptidase(s) utilizando substratos peptídicos de supressão intramolecular de fluorescência.

## ***MATERIAL E MÉTODOS***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Fluxograma

A **Figura 3** apresenta o fluxograma resumido das etapas metodológicas propostas neste trabalho, para a produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*.



**Figura 3.** Fluxograma das etapas realizadas para produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*. Inicialmente foram realizados os estudos dos parâmetros fermentativos para os dois bioprocessos, com o extrato obtido nesta fase foi realizada uma caracterização parcial e a peptidase obtida no bioprocessos de maior rendimento foi purificada, sendo realizados estudos cinéticos e caracterização bioquímica. Foto *Aspergillus flavus* retirada de: SickHouseCenter.com-Copyright © 2009. \* estudos de parâmetros somente realizados nos Bioprocessos fermentativos submersos.

## 3.2 Microrganismo e manutenção

O fungo *Aspergillus flavus* pertence ao banco de cultura do laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

O microrganismo foi isolado de silagem de milho e cana de açúcar, sendo identificado por técnica de morfologia, biologia molecular e bioquímica pelo grupo coordenado pelo Prof. Dr. André Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Microbiologia do Instituto de Biociências de Rio Claro (Unesp).

O microrganismo foi mantido em meio *Potato Dextrose Agar* (PDA), sendo repicado em tubos de ensaio e mantidos em incubadora (B.O.D) por um período de aproximadamente 7 dias na temperatura de 30°C. Após o crescimento, os tubos foram mantidos em geladeira a 4°C.

Para a realização dos bioprocessos o fungo foi repicado para tubos de ensaio contendo 5mL de meio PDA e incubados por 7 dias a 30°C.

## 3.3 Bioprocesso Fermentativo

### 3.3.1 Bioprocesso Fermentativo em estado sólido (BFs)

Para o BFs foi utilizado saco plástico autoclavável (polipropileno) (12 x 20 cm) segundo metodologia de Lotong e Suwanarit (1985) com um fio de cobre encapado em cada saco plástico para aumentar a aeração. Em cada saco foi adicionado o resíduo agroindustrial, farelo de trigo (5g), variando essa quantidade dependendo do estudo a ser realizado. Neste meio foi adicionado solução salina 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  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (MERHEB-DINI et al., 2009) sendo o volume de solução salina adicionado em cada saco correspondendo a 66% da umidade inicial (m/v) ou seja 10 mL. Então o material foi previamente autoclavado por 40 minutos a 121°C. Os procedimentos de preparo do inóculo e posterior inoculação do material, tanto no BFs, quanto no BFSm foram feitos em cabine de segurança.

Para o preparo do inóculo, esporos do fungo obtidos a partir de culturas estoques foram ressuspensos em solução salina estéril, e quantificado em câmara de Neubauer, determinando assim o volume de solução de esporos a ser inoculado na proporção de  $5 \times 10^6$  esporos para cada 5g de substrato.

Os sacos já com inoculo foram mantidos em B.O.D., a 30°C, exceto para o ensaio de temperatura, por um período de 24 a 168 horas. A cada 24 horas um saco foi removido da incubadora e a este foram adicionados 40 mL de água destilada a 4°C. O material então era macerado, filtrado em gaze e centrifugado a 5000xg por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante, denominado extrato fermentado (EF), foi coletado para a quantificação das atividades enzimáticas.

No processo de produção da peptidase alguns parâmetros foram investigados, e a cada resultado obtido, a melhor condição foi adotada para o experimento seguinte, desta forma foram avaliados: o efeito da variação dos tipos de indutores (caseína e ovoalbumina) nas porcentagens de 5, 10 e 20%, concentração de esporos ( $1 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^6$  e  $5 \times 10^6$ ) e temperatura de fermentação (30; 35; 40 e 45°C).

### **3.3.2 Bioprocesso Fermentativo em estado submerso (BFSm)**

Para o BFSm foi utilizado erlenmeyer de 250mL no qual foram adicionados 50mL de meio líquido padrão contendo: ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,7%;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2%;  $\text{MgSO}_4$  0,01%;  $\text{NaCl}$  0,5%; extrato de levedura 0,1%; peptona 0,1% e caseína 0,5%) em pH 6.

O meio foi previamente autoclavado por 15 minutos a 121°C. Todo o processo submerso foi realizado por um período de 24 a 168 horas sob agitação de 120rpm para aeração e a 30°C (exceto para o ensaio do efeito da variação de temperatura).

Para o preparo do inoculo, esporos do fungo foram ressuspensos em água destilada estéril e quantificada da mesma forma que no BFs, desta forma determinando o volume de esporos a ser inoculado por mL de meio.

No BFSm foram avaliados alguns parâmetros que influenciam a produção de peptidase como: o efeito da fonte de carbono: glicose, sacarose e frutose nas porcentagens (0,1; 0,5 e 1,0%); o efeito da fonte de nitrogênio (caseína) nas porcentagens (0,25, 0,5 e 1,0%), variação da concentração de esporos ( $1 \times 10^5$ ;  $2,5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$ ), variação do pH inicial do meio (5; 6; 7 e 8) e o efeito da temperatura (30; 35; 40 e 45°C).

A cada 24 horas foi removido um frasco e seu conteúdo foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 para separação do produto da fermentação e a massa

micelial. O micélio coletado foi mantido em estufa a 45°C até obter peso constante para posterior análise comparativa entre crescimento e atividade enzimática.

### 3.4 Avaliação da atividade proteolítica utilizando caseína como substrato

A atividade proteolítica foi determinada a cada etapa dos bioprocessos através do protocolo descrito por Sarath, Motte e Wagner (1996), utilizando caseína como substrato previamente dissolvida em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5 .

Para a padronização dos ensaios todos os reagentes foram mantidos a 37 °C para as soluções estarem na mesma temperatura.

Nos ensaios foram utilizados 200µL de EF do BFSm e 50µL de EF do BFs a esses volumes foram adicionados 100µL de tampão fosfato de sódio 50mM, pH 6,5 e 1000µL de caseína 1% (m/v) preparada no mesmo tampão.

Os tubos foram incubados durante 1h no caso do EF da BFSm e 30 minutos para o EF da BFs. Decorrido esse período a reação foi interrompida adicionando 600µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (m/v). Em seguida, os tubos testes e brancos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000xg em temperatura ambiente (TA).

Os sobrenadantes dos tubos testes foram lidos em espectrofotômetro, Genesys 10S usando cubetas de quartzo contra seus respectivos brancos em 280nm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

A atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade/mL (U/mL), sendo definida como unidade de atividade a quantidade de enzima necessária para promover a liberação de 1 µmol tirosina/minuto sob condições definidas (MEYERS & AHEARN<sup>1</sup>, 1977 *apud* GUPTA et al, 2002).

---

<sup>1</sup> MEYERS, S.P. & AHEARN, D. G. Extracellular proteolysis by *Candida lipolytica*. **Mycologia**, v. 69, p. 646 – 651, 1977.

### **3.5 Precipitação por etanol e filtração tangencial**

Antes da purificação propriamente dita, foi realizada a caracterização das enzimas produzidas em ambos os bioprocessos.

O EF obtido no BFSm foi submetido a precipitação pelo etanol e o EF do BFs sofreu uma filtração tangencial utilizando FlexStand Benchtop System (GE Healthcare Life Sciences) acoplado a um cartucho com membrana de corte 10kDa Hollow Fiber Cartridge Modelo UFP-10-E-3MA .

No aparelho de filtração tangencial o extrato fermentado entra no sistema com auxílio de uma bomba peristáltica, esse líquido passa pela membrana de corte sendo reduzido a um volume menor do que o inicial. O concentrado obtido neste processo foi posteriormente precipitado com etanol.

Os solventes orgânicos tem a propriedade de diminuir a interação água-proteína fazendo com que as mesmas sofram precipitação quando em solução. No caso do etanol (92,6° GL), além desta propriedade é um produto barato quando comparado a outros solventes, por isso foi utilizado para precipitar o EF dos bioprocessos. Para determinar a melhor condição de precipitação, diferentes proporções de EF e etanol foram testados. Definida a melhor proporção EF: etanol, o fracionamento foi conduzido a -20°C, *overnight*. Decorrido esse período a solução foi centrifugada a 5000xg por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuscitado em água purificada por Osmose Reversa OS 10 LX. A solução obtida foi então denominada extrato enzimático (EE).

### **3.6 Caracterização Bioquímica do extrato enzimático do BFs e BFs utilizando como substrato azocaseína**

Para caracterização bioquímica do EE de ambos os bioprocessos, foi utilizado como substrato para a determinação da atividade proteolítica azocaseína.

A azocaseína é um derivado da caseína ao qual foi adicionado um grupo sulfonilamida, sendo que este grupo confere cor alaranjada ao reagente. Quando

hidrolisada por peptidases a azocaseína libera componentes coloridos solúveis na presença de TCA (CHARNEY; TOMARELLI, 1947).

A mistura da reação foi composta por 100 µL de EE; 150 µL de tampão no pH adequado; e 300 µL de azocaseína 1 % no pH adequado. A reação foi conduzida inicialmente a 30°C, por 10 minutos. Decorrido esse período a reação foi interrompida adicionando 1200 µL de TCA 10% em cada tubo. Para os tubos definidos como branco foi utilizado às mesmas quantidades e condições dos tubos testes, diferindo apenas no fato do TCA ter sido acrescentado no início do ensaio, assim precipitando as proteínas presente na solução e evitando a hidrólise do substrato.

Todos os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 10.000xg a TA. Foram transferidos 1200 µL do sobrenadante para um tubo de ensaio e a este foram adicionados 1400 µL de NaOH 1M e misturados. O material foi quantificado utilizando cubetas de plástico, contra seus respectivos brancos em 440nm, em espectrofotômetro (Genesys 10S) (DUCROS et al., 2009).

Os parâmetros estudados na caracterização foram: efeito da influência do pH, temperatura e inibidores.

O pH ótimo foi determinado avaliando-se a atividade do EE em diferentes valores de pH, de 4,5 a 10,5 com incrementos de 0,5 unidades de pH. Os tampões utilizados foram: Acetato, pH 4,5 – 5,0; MES, pH 5,5 – 6,5; HEPES, pH 7,0 – 8,0; BICINE, pH 8,5 – 9,0; e CAPS, pH 9,5 – 10,5. Para o EE da BFs os tampões estavam a 100 mM e para o EE da BFSm estavam a 50mM. A reação enzimática foi realizada de acordo com o que já foi descrito anteriormente.

Com o pH ótimo estabelecido o próximo passo foi identificar a temperatura ótima. Para tanto o EE proveniente do BFs foi exposto a faixa de temperatura de 25 a 80°C, com incrementos de 5°C e o EE proveniente do BFSm de 30 a 65°C, com incrementos de 5°C. As reações enzimáticas foram realizadas, como descrito anteriormente, utilizando o, tampão MES 100 mM pH 6,5 para o EE da BFs e tampão HEPES 50mM pH 7,5 para o EE da BFSm.

Após a determinação do pH e temperatura ótimo foi feita uma investigação para saber a influência de inibidores sobre a atividade enzimática do EE. Para a

realização dos ensaios foram preparadas soluções estoques dos respectivos inibidores: fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF), etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e Ácido Iodoacético na concentração de 100 mM (estoque) segundo protocolo descrito por Dunn (1989).

Em cada tubo de reação foi adicionado EE e a esse foi acrescentado um volume de cada solução de inibidor, obtendo concentração final de 10 mM. Os tubos foram incubados por 5 minutos nas temperaturas ótimas. A reação enzimática foi realizada como descrito anteriormente, utilizando o tampão MES 100 mM pH 6,5 para o EE da BFs e tampão HEPES 50mM pH 7,5 para o EE da BFSm. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

### **3.7 Purificação**

#### **3.7.1 Cromatografia de exclusão de massa molecular e troca iônica**

Para obtenção de frações purificadas da enzima obtida no BFs, o EE foi submetido a uma gel filtração em coluna de dimensões 100 x 4 cm preenchida com resina Sephacryl<sup>TM</sup> S100, equilibrada com tampão Bicine 20 mM, pH 8,5 acrescido de 150mM de NaCl.

Foram aplicados 3 mL do EE proveniente do BFs e eluidas no mesmo tampão de equilíbrio. O fluxo de eluição foi ajustado para aproximadamente 0,63 mL/min com auxílio de bomba peristáltica sendo coletadas frações de 5mL por tubo utilizando coletor de frações.

As frações com atividade proteolítica foram reunidas, totalizando 100mL, e esse volume foi submetido a uma diálise em membrana com poro de 10 kDa para retirada de sal contra 2L de tampão Bicine 20mM pH 8,5 a 4°C, com 2 trocas de tampão.

Em seguida, a amostra foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna Tricon<sup>TM</sup> 10/50 com resina aniônica, Source<sup>TM</sup> 15Q, (GE Healthcare Life Sciences) acoplado em AKTA purifier CU 950.

A coluna primeiramente foi equilibrada com tampão Bicine 20 mM, pH 8,5. A amostra foi aplicada e em seguida, foi realizada a etapa de lavagem com o tampão de equilíbrio, somente após esta etapa, iniciou-se o gradiente salino linear com a concentração crescente de NaCl de 0 a 200mM.

O eluído foi coletado em tubos com auxílio de coletor de frações. Foi realizada a massa molecular do ensaio de atividade proteolítica conforme descrito no item 3.4.

Após realização dos processos cromatográficos foi determinada a concentração de proteínas totais de cada etapa, desde a produção até a purificação da peptidase, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### **3.8 Avaliação do grau de pureza, estimativa da massa molecular e atividade gelatinolítica da peptidase purificada**

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

Para avaliação da atividade colagenolítica foi realizado um zimograma com gelatina como descrito por Kleiner e Stetler-Stevenson (1994).

### **3.9 Ensaios de caracterização bioquímica funcional e cinética enzimática**

#### **3.9.1 Substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência Abz-KLRSSKQ-EDDnp (FRET)**

A partir da peptidase purificada foram realizados os estudos de caracterização bioquímica funcional e cinética enzimática, utilizando substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência (FRET), fornecidos pelo Prof. Dr. Luiz Juliano Neto do Departamento de Biofísica da UNIFESP.

Esse substrato possui a característica de conter na extremidade amino-terminal o ácido orto-aminobenzóico (Abz), responsável pela emissão da fluorescência do peptídeo, e na extremidade carboxi-terminal o grupo etilenodiamodinitro-fenil (EDDnp) responsável pela supressão da fluorescência (CHAGAS et al., 1991).

Quando as extremidades Abz e EDDnp estão próximas, isto é, quando o peptídeo ainda está íntegro, o grupo EDDnp promove a supressão da fluorescência emitida pelo grupo Abz, desta forma observa-se uma emissão de baixa fluorescência. Após a ação da peptidase, que promove a hidrólise do substrato,

ocorre o distanciamento entre os grupos Abz e EDDnp, conseqüentemente ocorre o aumento da emissão de fluorescência.

### **3.9.2 Condições para o ensaio de caracterização bioquímica funcional e cinética enzimática utilizando substratos FRET**

A caracterização bioquímica funcional e cinética enzimática foi monitorada utilizando espectrofluorímetro modelo *Lumina fluorescence spectrometer* (Thermo scientific) acoplado ao sistema *Peltier 4-Position Fluorescence Cell Holder*, responsável pelo controle da agitação e temperatura. Foram utilizadas cubetas de quartzo com caminho ótico de 10 mm. Os comprimentos de ondas foram ajustados para  $\lambda_{ex}$ : 320nm e  $\lambda_{em}$ : 420nm. O *software* utilizado foi o *Luminous Software* version 3.0.

Para a caracterização bioquímica funcional da enzima purificada foram investigados: o efeito de pH, temperatura e suas respectivas estabilidades, inibidores e íons, além de surfactantes, DTT e ureia. Foi analisado também o efeito de altas concentrações de NaCl na atividade catalítica. Todos os ensaios da caracterização bioquímica funcional foram realizados em triplicata.

### **3.9.3 Efeito de pH e Temperatura**

O pH ótimo, a temperatura ótima, bem como suas respectivas estabilidades foram determinadas avaliando o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

A atividade da enzima purificada foi analisada em diferentes valores de pH, de 4,5 a 10,5 com incrementos de 0,5 unidades de pH. Os tampões utilizados foram os mesmos utilizados nos itens 3.6, todos a 100 mM.

O substrato utilizado foi Abz-KLRSSKQ-EDDnp, na concentração final de  $3,66 \times 10^{-4}$  mM e a concentração final da enzima foi de 0,58 mM. O experimento de pH foi realizado na temperatura de 40°C.

Uma vez definido o pH ótimo, a temperatura ótima foi determinada expondo a enzima nas faixas de 25 a 65°C, com incrementos de 5°C. Com esses dados obtidos foi realizado os ensaios de estabilidades.

A estabilidade em diferentes valores de pH foi avaliada pela incubação da enzima purificada durante 60 minutos a 25°C nas faixas de pH (4,0-10,5) a 100mM variando o pH com incrementos de 0,5 unidade. Após a exposição foi realizado o

ensaio no pH e temperatura ótima, sendo avaliado o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

A estabilidade à temperatura foi realizada incubando-se a enzima purificada por períodos estabelecidos de 5, 15, 30 e 60 minutos, nas faixas de 30 a 60°C, com incrementos de 5°C. Após a exposição foi realizado o ensaio no pH e temperatura ótima, sendo avaliado o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

### **3.9.4 Efeito de Íons e Inibidores**

Para determinar o efeito de íons sobre a atividade catalítica da enzima purificada, foram preparadas soluções de: NaCl, ZnSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, BaCl<sub>2</sub> e AlCl<sub>3</sub>, KCl, NiSO<sub>4</sub>, MnCl<sub>2</sub>, LiCl todos a 100 mM (estoque).

Os inibidores testados foram: fluoreto de fenilmetilsufonil (PMSF), ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), pepstatina, todos a 100 mM (estoque) e também quimostatina, E-64 e inibidor de tripsina todos a 100µM (estoque) segundo protocolo descrito por Dunn (1989).

Em cada tubo de reação foi adicionado enzima purificada e solução de cada íon ou inibidor, obtendo concentração final de 0,5 mM para todos os íons e 0,5 mM para o PMSF, EDTA e pepstatina e 0,5 µM para quimostatina, E-64 e inibidor de tripsina. Os tubos foram pré-incubados por 5 minutos a 35 °C para interação entre a peptidase e íons/ inibidores, decorrido esse tempo foi avaliando o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

### **3.9.5 Efeito de Surfactantes, DTT e ureia na atividade catalítica da peptidase purificada**

O efeito de surfactantes sobre a atividade catalítica da peptidase purificada, foi analisado utilizando variações crescentes nas porcentagens 0,01 a 0,04% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS); e nas porcentagens de 0,1 a 1% de Brometo de Cetil Trimetil Amônio (CTAB) e Tween-20<sup>®</sup> (Polissorbato 20). O efeito do ditioneitol (DTT) sobre a atividade da peptidase, foi avaliado nas concentrações de 5 a 200mM e para ureia a enzima foi exposta a variações crescentes nas concentrações de 100mM a 2M.

A enzima purificada foi previamente incubada por 5 minutos a 35 °C com cada surfactante, agente redutor e ureia nas suas respectivas porcentagens e concentrações, decorrido esse tempo foi avaliado o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

### **3.9.6 Reversão da atividade catalítica causada por metal pesado utilizando DTT**

Foi observado que a peptidase em presença do íon  $\text{Cu}^{2+}$  apresenta perda de atividade. Na tentativa de estudar se esse processo era reversível ou irreversível foi realizado um protocolo onde a peptidase purificada foi exposta a um concentração de 1mM de  $\text{CuCl}_2$ , valor que corresponde a 100% de inativação da enzima. Em seguida, a enzima foi incubada com concentrações crescentes de DTT (0,1mM a 2mM). A atividade enzimática foi avaliada com o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

### **3.9.7 Determinação do efeito do NaCl sobre a atividade catalítica**

O efeito do NaCl sobre a atividade catalítica foi avaliado por adições de concentrações crescentes (0-3M) deste sal, na presença de tampão MES 100mM pH 6,5 e mantida a 35°C. A atividade enzimática foi avaliada com o aumento de fluorescência emitida pelo substrato após hidrólise pela peptidase.

## **3.10 Estudos de cinética enzimática**

### **3.10.1 Determinação da concentração molar da peptidase purificada**

Para realização dos estudos cinéticos foi necessário conhecer a concentração molar da peptidase para posterior cálculo de  $k_{\text{cat}}$  e eficiência catalítica, para tanto, a molaridade foi determinada por titulação do sítio ativo conforme metodologia descrita por Turk et al. (1993), no entanto, utilizando inibidor PMSF a 100mM para a titulação.

A titulação foi estimada em espectrofluorímetro modelo *Lumina fluorescence spectrometer* (Thermo scientific) utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, em tampão MES 100 mM, pH 6,5 a 35°C. Os comprimentos de onda de fluorescência foram ajustados para  $\lambda_{\text{ex}}$ : 320nm e  $\lambda_{\text{em}}$ : 420nm.

### 3.10.2 Ensaios cinéticos com substrato sintético com supressão intramolecular de fluorescência

Os parâmetros cinéticos  $K_M$ ,  $k_{cat}$  e  $k_{cat}/K_M$  da peptidase purificada foram determinados utilizando-se os substratos peptídicos com supressão intramolecular de fluorescência. O substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp é considerado o substrato padrão, no qual foram realizadas as substituições dos aminoácidos nas posições  $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ,  $P'_1$ ,  $P'_2$  e  $P'_3$ , permitindo assim avaliar qual aminoácido interage melhor com cada subsítio, desta forma propiciando uma melhor eficiência catalítica da enzima.

Os experimentos foram realizados utilizando tampão MES 100mM pH 6,5 a 35°C e espectrofluorímetro, modelo já descrito. Os comprimentos de onda foram ajustados para  $\lambda_{ex}$ : 320nm e  $\lambda_{em}$ : 420nm. As cinéticas enzimáticas foram obtidas pela adição crescente de substrato na reação.

Os valores cinéticos de  $K_M$  e  $V_{max}$  foram obtidos a partir da equação de *Michaelis-Menten* calculada por regressão não linear dos dados de hidrólise do substrato usando o programa GraphPad versão 5.0. Todos os ensaios foram feitos em duplicata.

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Bioprocesso Fermentativo em estado sólido (BFs)

De acordo com as condições oferecidas para o desenvolvimento do microrganismo, se obtém uma resposta favorável ou desfavorável a obtenção de produtos de interesse, que no caso específico deste trabalho foi à produção de peptidase. Desta forma o primeiro parâmetro avaliado foi o efeito da suplementação do meio padrão, farelo de trigo, com fontes de N orgânico (caseína e ovoalbumina) (**Figura 4 A e B**).

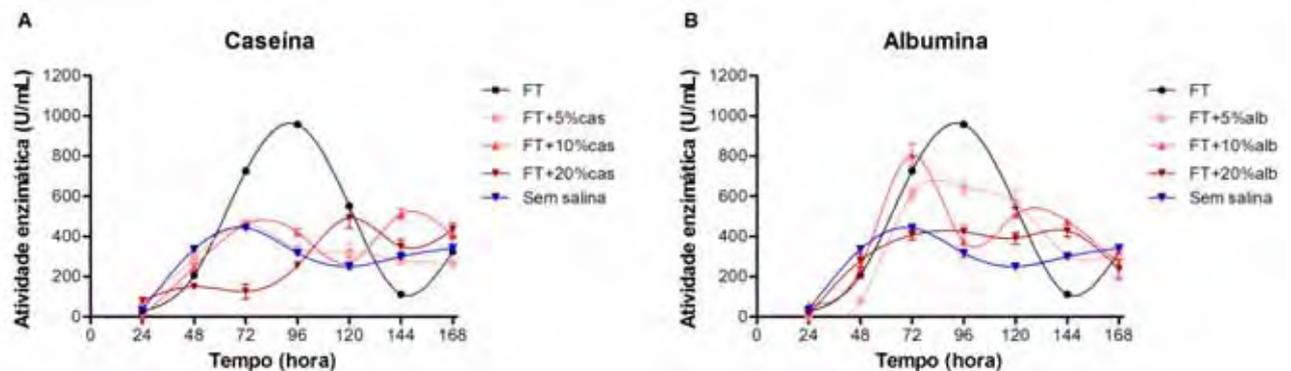
Nas proporções de 5 e 10% de caseína obteve-se valores iguais de atividade enzimática, 460 U/mL, em 72 horas de incubação e para a proporção de 20% o pico máximo ocorreu em 120 horas de incubação com produção de 492 U/mL (**Figura 4A**). Para a ovoalbumina (**Figura 4B**), o maior valor obtido foi de 805,65 U/mL na proporção de 10% em 72 horas de incubação. Para as proporções de 5 e 20% os valores foram de 643 U/mL e 423 U/mL, respectivamente. O aumento das proporções de ovoalbumina no meio não foi proporcional ao aumento na produção de peptidase, pois se observa uma repressão da síntese de peptidase na proporção de 20%.

Apesar dos valores obtidos com a suplementação do meio com caseína e ovoalbumina, o fungo *Aspergillus flavus* apresentou melhor produção enzimática quando cultivado somente com meio padrão, isto é, farelo de trigo, com pico de produção de 957,65 U/mL em 96 horas de incubação. Resultado semelhante foi observado por Silva et al (2013) na produção de peptidase por *Aspergillus fumigatus* Fresenius com valor máximo de produção de 1300 U.A (unidade de atividade) em 96 horas.

O uso de resíduos agroindustriais como meio fermentativo para produção de enzimas, tem tido grande apelo devido ao baixo custo. O que agrega valor ao produto final (Maller et al. 2011).

A produção de peptidase utilizando somente farelo de trigo sem suplementação de fonte adicional de N também foi observada por Rajkumar et al. (2011) na produção de uma metalo peptidase por *Bacillus sp.* RRM1, e também por

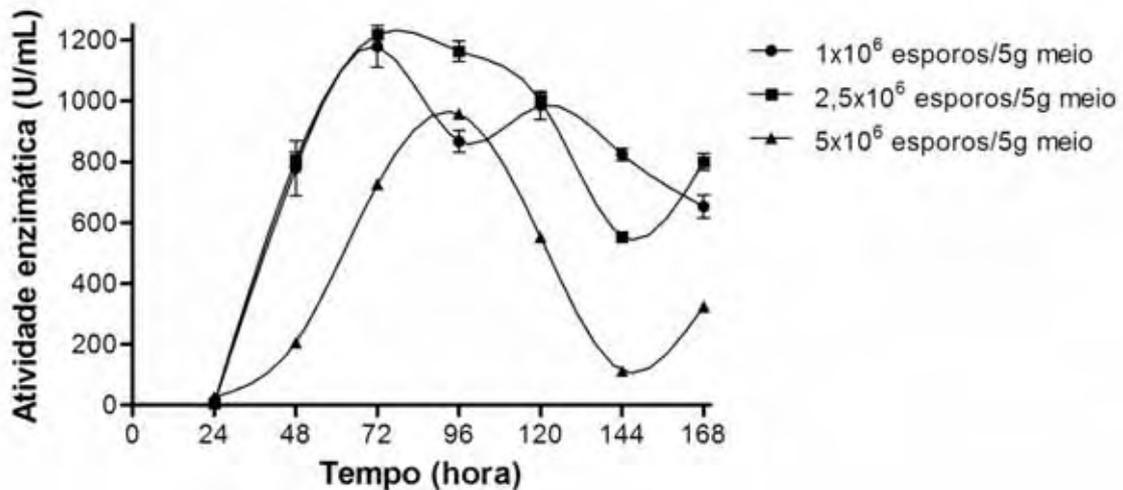
Vishwanatha et al., (2010) na produção de peptidase ácida extracelular por *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Segundo este autor, o teor de proteínas presente no farelo de trigo é de 14 a 16%, e provavelmente esse teor proteico elevado do substrato tenha colaborado para a melhora na produção da peptidase.



**Figura 4.** Influência da suplementação do resíduo agroindustrial, farelo de trigo (FT) com: **(A)** caseína e **(B)** ovoalbumina, como fonte de N adicional nas proporções de 5, 10 e 20%; na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*, mantido a 30°C e com  $5 \times 10^6$  esporos/5g de meio.

Podemos observar que a fermentação realizada na ausência total de fonte de nitrogênio, isto é, utilizando apenas água para umidificar o meio foi favorável a produção, no entanto os valores obtidos ficaram abaixo do observado quando o meio era umidificado com solução salina, demonstrando desta forma que a fonte de nitrogênio inorgânica presente na solução salina contribui satisfatoriamente para a produção de peptidase.

O fungo *Aspergillus flavus* apresentou melhor produção quando inoculado com  $2,5 \times 10^6$  esporos, com um pico de 1.217,92 U/mL com 72 horas de fermentação utilizando F.T. como substrato (**Figura 5**).

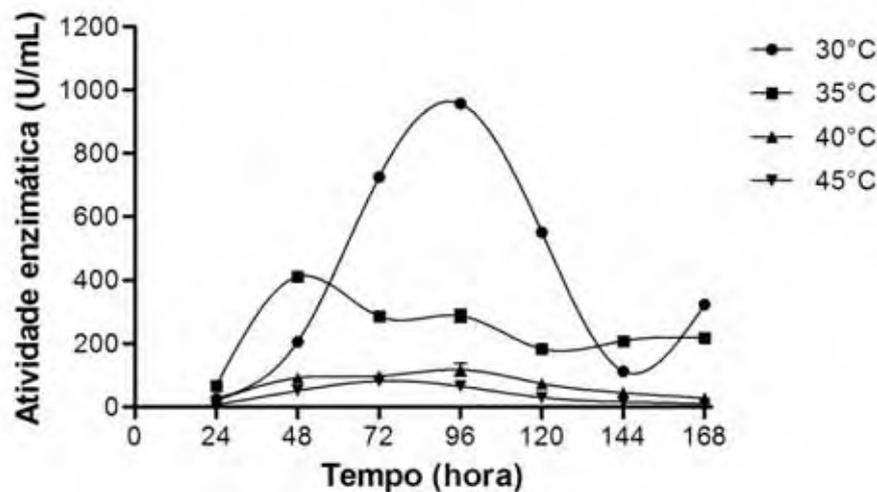


**Figura 5.** O gráfico apresenta a influência da concentração de inóculo na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*, utilizando farelo de trigo como substrato e mantido a 30°C por um período de 168 horas.

Nota-se que em 72 horas tanto para o inóculo com concentração de  $2,5 \times 10^6$  quanto para  $1 \times 10^6$  não existe diferença estatística significativa (Two-way ANOVA  $P > 0,05$ ) ocorrendo uma baixa produção nesse mesmo tempo para concentração de  $5 \times 10^6$ .

Esse dado difere do observado em *Aspergillus niger* quando comparado concentração de inóculo e produção enzimática (KAVYA; PADMAVATHI, 2009). Provavelmente a rápida densificação e conseqüentemente exaustão de nutrientes faça com que as maiores concentrações de inóculo não sejam apropriadas para essa condição estabelecida, pois nota-se um decréscimo da produção ao longo do período. Semelhante resultado foi relatado por Silva et al. (2013) na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus fumigatus* Freseneus, observando pico de produção na concentração de  $1 \times 10^6$  esporos/g de farelo de trigo.

Um dos parâmetros físicos de maior importância nos bioprocessos é a temperatura, pois afeta o metabolismo alterando crescimento e conseqüentemente a produção de enzimas (KRISHNA, 2005). A melhor temperatura para produção de peptidase pelo BFs ocorreu a 30°C (**Figura 6**). Nas temperaturas de 40°C e 45°C a produção de peptidase foi basal quando comparado com o observado a 30°C e a 35°C. Resultado semelhante foi observado em *Bacillus sp.*MIG (GOUDA, 2006).



**Figura 6.** Influência da temperatura na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*, utilizando farelo de trigo como substrato e  $2,5 \times 10^6$  esporos/5g de farelo de trigo. O gráfico apresenta os valores de produção obtidos quando o fungo foi cultivado em diferentes faixas de temperatura.

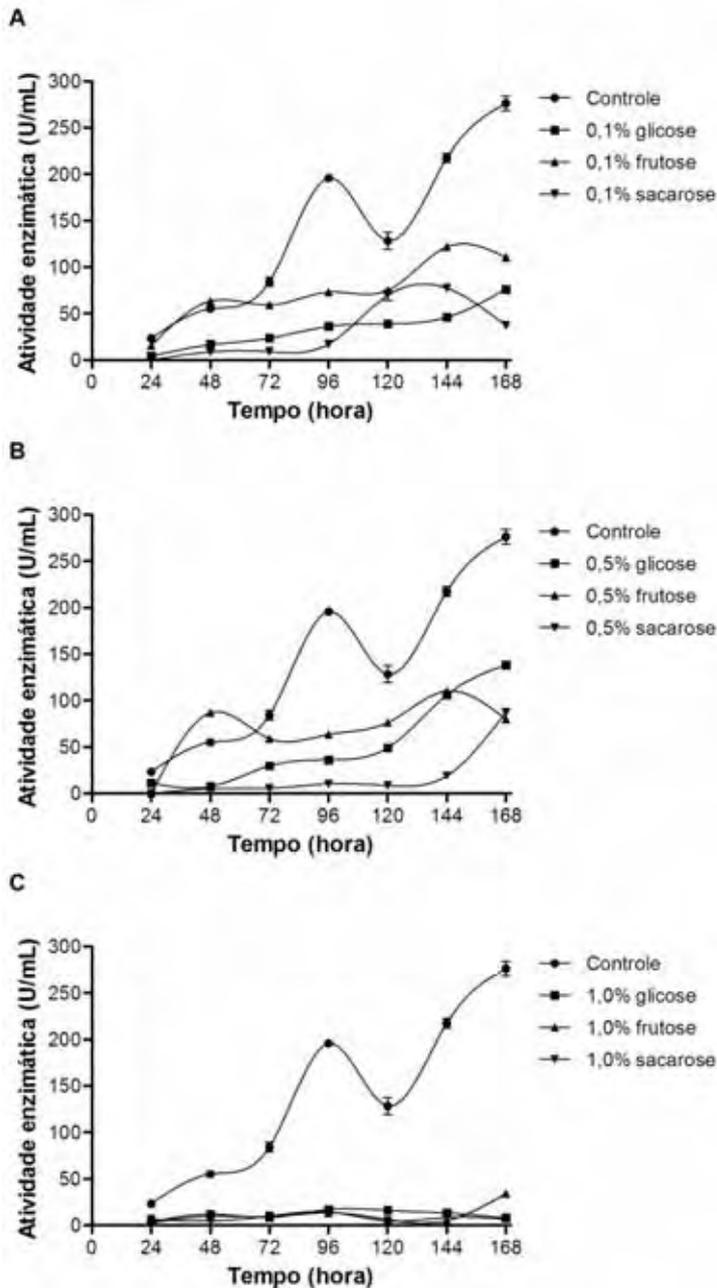
#### 4.2 Bioprocesso Fermentativo em estado submerso (BFSm)

O carbono é um elemento de fundamental importância na biossíntese de moléculas como: proteínas, carboidratos, lipídeos e ácidos nucleicos; além de constituir cerca de 50% da massa seca de uma célula típica (PEREIRA JR; BON; FERRARA, 2008).

A **Figura 7A, B e C** demonstra o efeito da suplementação do meio fermentativo com fontes de carbono: glicose, frutose e sacarose nas concentrações 0,1, 0,5, e 1%. A partir dos dados coletados sugere-se que o fungo *Aspergillus flavus* não mostrou dependência a nenhuma fonte de carbono testada, em relação ao experimento controle, que não possui adição de fonte de carbono.

O pico de produção foi de 276,25 U/mL em 168 horas com o meio padrão. Não foi observado efeitos expressivos na suplementação do meio com 0,5% de fonte de carbono, porém o perfil de produção foi praticamente o mesmo. Na concentração de 1%, para todas as fontes de carbono, foi observada uma queda na produção enzimática, sugerindo que o aumento da concentração da fonte de

carbono atua como um repressor na síntese de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus* (**Figura 7 A, B e C**). Observamos que o meio suplementado com sacarose nas três proporções testadas não apresentaram valores de produção elevados, provavelmente o baixo rendimento obtido pode ser devido à formação de invertases para a proporção de 0,1% e 0,5% e para a proporção de 1% uma possível justificativa é a repressão catabólica, como já mencionado.



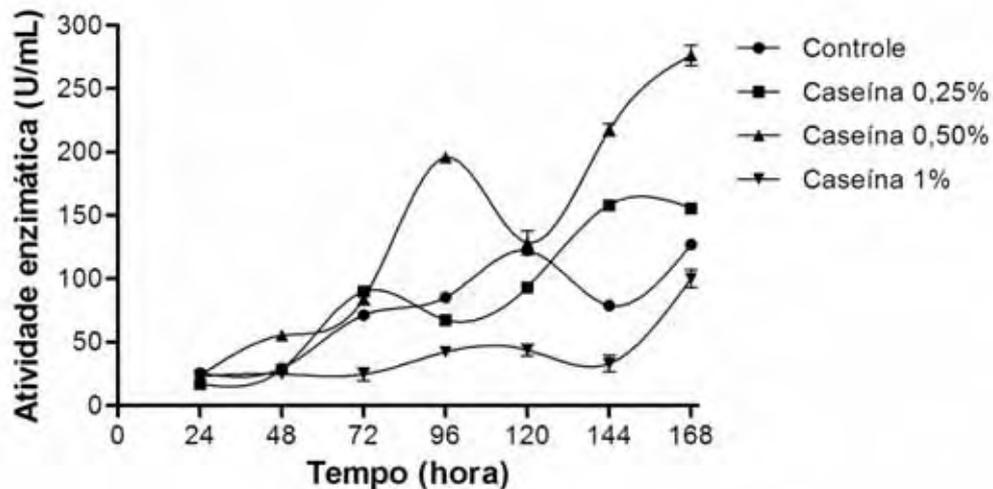
**Figura 7.** Influência da suplementação do meio no BFSm com três fontes de carbono: frutose, glicose e sacarose, nas porcentagens **(A)** 0,1%, **(B)** 0,5% e **(C)** 1% na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*. Meio contendo 0,5% de caseína, pH inicial 6, cultivado a 30°C e com  $5 \times 10^5$  esporos/mL de meio, com agitação de 120rpm. Controle =meio sem suplementação adicional de fonte de carbono

Segundo Gouda et al., (2006) a adição de 1% de sacarose, frutose e glicose ao meio fermentativo para produção de enzimas alcalinas (Pro 1 e Pro 2), reduziu a produção enzimática por *Bacillus sp.* MIG. Mehta, Thumar, Singh (2006) observou esse mesmo efeito com 2% de glicose. Alegre et al., (2009) observou que, a produção de invertase extracelular pelo fungo *Aspergillus caespitosus* era afetada em 93%, comparado com valores de produção inicial, quando o meio era suplementado com 2% de glicose, no entanto, porcentagens de 1% de glicose aumentava em até 5x a produção de invertase intracelular. Esses exemplos demonstram que a fonte de carbono pode exercer uma modulação epigenética na produção de metabólitos. Mellon; Cotty; Dowd, (2007) relatam carboidratos de baixo peso molecular, como glicose e frutose, funcionariam como repressores catabólicos para produção de hidrolases pelo fungo *Aspergillus flavus* corroborando com os nossos dados.

Outro elemento que regula a expressão e secreção de metabólitos são as fontes de nitrogênio. Para a maioria dos microrganismos fontes de nitrogênio, orgânica ou inorgânica, são metabolizados para produzir aminoácidos e outras moléculas como ácidos nucleicos, proteínas e constituintes da parede celular, sendo, portanto, compostos de grande importância (IBRAHIM; AL-SALAMAH, 2009; THUMAR; SINGH, 2007) podendo chegar a constituir 15% do valor do peso seco de uma célula (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

O estudo da suplementação do meio fermentativo com caseína, como fonte de nitrogênio, demonstra que na proporção de 0,5% a caseína agiu como indutor da síntese enzimática, promovendo um aumento na produção de 129,83% em relação ao controle, no período de 96 horas de fermentação.

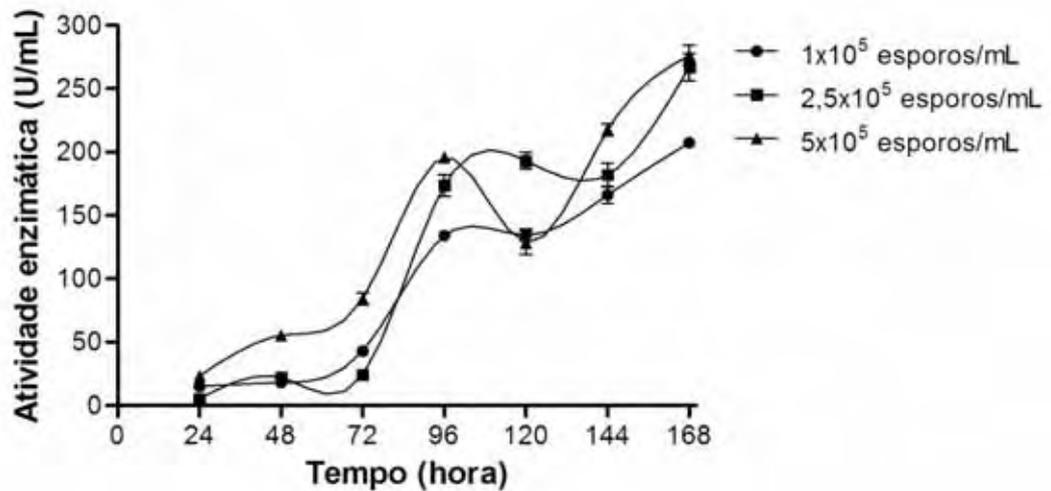
Na proporção de 1% a produção foi reprimida durante todo o processo, apresentando um aumento no período de 168 horas, no entanto, esse valor representa apenas 36,25% da produção quando comparado ao controle no mesmo período (**Figura 8**). Resultado semelhante foi observado em *Bacillus subtilis* (DUTT et al., 2007).



**Figura 8.** Influência da suplementação do meio no BFSm com caseína nas proporções de: 0,25; 0,5 e 1% na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*, pH inicial do meio 6, cultivado a 30°C, com  $5 \times 10^5$  esporos/mL de meio, com agitação de 120rpm. Controle = meio sem caseína.

Outro parâmetro relevante estudado foi à concentração de inoculo (**Figura 9**). Observamos que para as três concentrações a produção enzimática foi maior no tempo de 168 horas, indicando uma produção tardia ou em função da disponibilidade de nutrientes e/ou outro componente disponível para o metabolismo do organismo. Fixando um período para comparar os valores obtidos notamos que, nas concentrações de  $5 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  e  $1 \times 10^5$  esporos/mL meio obtivemos 195,98 U/mL, 176,87 U/mL e 134,13 U/mL, respectivamente em 96 horas de cultivo.

Foi observado que a concentração de esporos influenciou diretamente a produção de peptidase e a maior concentração dentre os valores testados, ou seja,  $5 \times 10^5$  esporos, ao longo de todo o processo foi o que mais induziu a produção de peptidase e não levou a densificação do meio, e conseqüente exaustão de nutrientes, como observado no BFs.

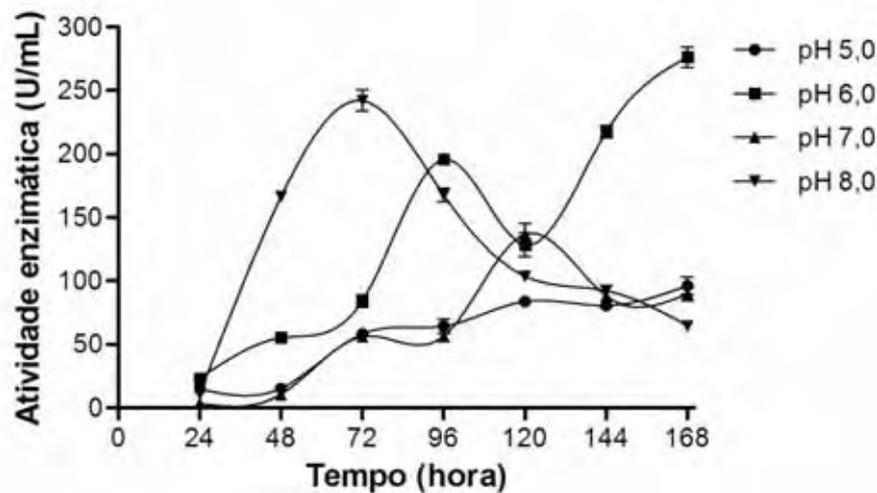


**Figura 9.** Influência da concentração de esporos no BFSm nas concentrações  $1 \times 10^5$ ,  $2,5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^5$ , na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*. Meio contendo 0,5% de caseína, pH inicial 6, cultivado a  $30^\circ\text{C}$ , com agitação de 120rpm.

O efeito do pH sobre a produção e secreção da peptidase pode ser observado na **Figura 10**. Tanto a variação de temperatura quanto a variação de pH são de fundamental importância para o crescimento do microrganismo, desta forma, pequenas variações pode prejudicar secundariamente a produção enzimática. A variação da concentração de prótons no meio externo à célula influencia diversos processos fisiológicos, dentre esses destacamos o sistema de transporte da membrana plasmática. Uma alta ou baixa concentração de prótons pode modificar o sistema de transporte da célula fazendo com que o transporte de enzimas extracelulares seja prejudicado (HAQ; MUKTAR; UMBER, 2006).

O fungo *Aspergillus flavus* apresentou maior produção no pH 8, com 242 U/mL, em 72 horas de fermentação. Observando o período fermentativo como um todo notamos que utilizando o pH 6 como pH inicial houve um aumento da produção da peptidase durante todo o processo, superando o pH 8 após 96 horas de produção, no entanto, o menor tempo de cultivo foi considerado o ideal. Quando comparado o pH final versus crescimento observamos que o microrganismo

apresentou maior crescimento em pH mais ácido, 5 e 6, já para o pH 7 e 8 o crescimento foi observado mais tardiamente, 144 horas.

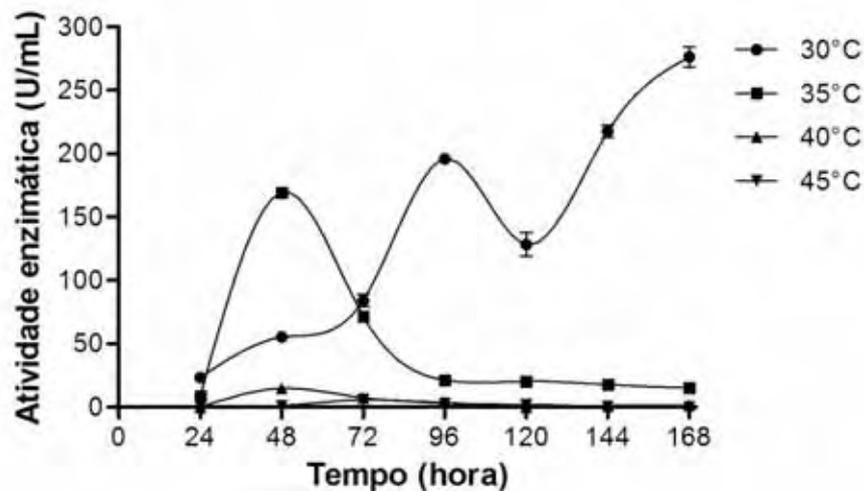


**Figura 10.** Influência do pH no BFSm, na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*. Meio contendo 0,5% de caseína,  $5 \times 10^5$  esporos/mL de meio, cultivado a 30°C, com agitação de 120rpm.

Todos os organismos possuem uma temperatura ótima para desempenhar suas funções metabólicas sem prejuízo de dano celular, total ou parcial. Alguns organismos toleram pequenas variações nessa faixa de temperatura, no entanto, é de fundamental importância o conhecimento da temperatura ótima, não somente para o crescimento do microrganismo, mas também para o produto formado, como é o caso das enzimas (PEREIRA JR; BON; FERRARA, 2008).

O efeito da temperatura na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus* se destacou a 30°C com o transcorrer do bioprocesso. Porém destacamos que, com 48 horas a 35°C a produção foi maior (169,42 U/mL) do que a 30°C (55,26 U/mL), mas apesar deste valor e levando em consideração o dano que sofreria a cultura na temperatura de 35°C, pois como se observa a produção decai em 72 horas, foi adotada a temperatura de 30°C como temperatura ótima. (**Figura 11**).

O fungo *Aspergillus flavus* não apresentou produção nas temperaturas de 40 e 45°C esse dado é contrário aos relatados por Macchione et al. (2008) que obtiveram uma boa produção de peptidase em BFSm, a 45°C em 8 dias com cepas de *Aspergillus sp.* Resultado semelhante ao nosso foi obtido por Hamin-Neto (2012), na produção de peptidase pelo fungo *Eupenicillium javanicum*.



**Figura 11.** Influência da temperatura na produção de peptidase pelo fungo *Aspergillus flavus*. Meio contendo 0,5% de caseína,  $5 \times 10^5$  esporos/mL de meio, pH inicial 8 sob agitação de 120rpm.

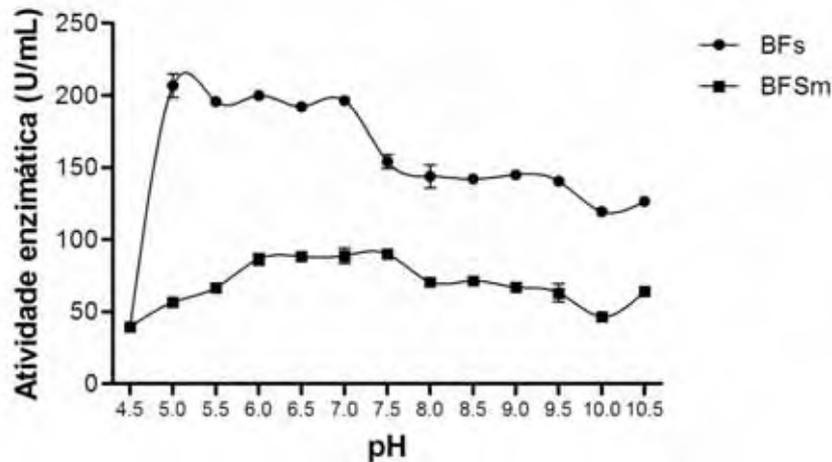
#### 4.3 Caracterização bioquímica dos extratos enzimáticos obtidos no BFSm e BFs utilizando como substrato azocaseína

Para conhecimento prévio da peptidase presente nos EE de ambos os bioprocessos, foram realizados experimentos de caracterização bioquímica, avaliando: pH, temperatura ótima e efeito de inibidores. A determinação prévia destes parâmetros auxiliam os experimentos futuros, tais como purificação e caracterização bioquímica da peptidase purificada.

Na **Figura 12** observamos o efeito do pH sobre a atividade da peptidase do BFs e BFSm. A princípio, o pH ótimo do BFs foi considerado 5, porém observamos um platô de atividade do pH 5 ao pH 7, apresentando uma ligeira queda a partir do pH 7,5, no entanto, mantendo 61% de atividade no pH 10,5 em relação ao pH 5.

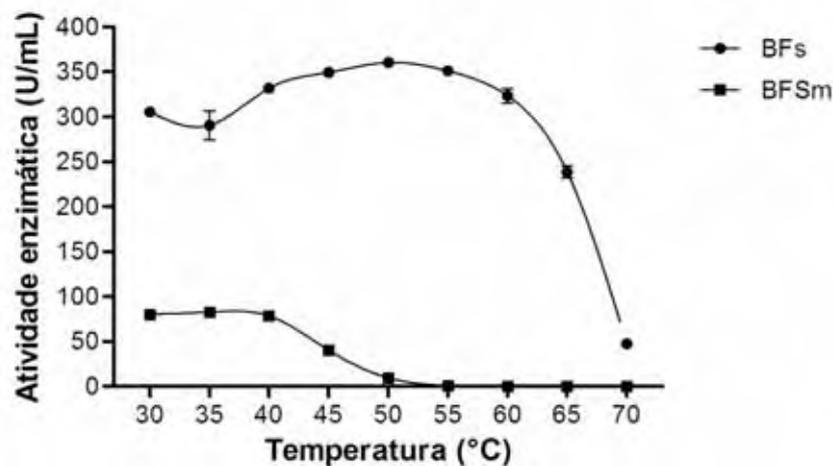
Em relação ao BFSm observamos um platô de atividade ótima do pH 6 ao pH 7,5, não sendo possível identificar um ponto específico de pH ótimo. Acima do pH

7,5 até o pH 10,5 ocorre uma queda na atividade, assim como observado no BF<sub>s</sub>, mantendo 74% de atividade em relação ao pH 6.



**Figura 12.** Determinação do pH ótimo da peptidase presente no extrato enzimático produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* nos BF<sub>s</sub> e BF<sub>Sm</sub>. Variação de pH de 4,5 a 10,5, utilizando azocaseína como substrato a 40°C.

O efeito da temperatura sobre a atividade da peptidase presente no EE produzido pelo fungo *Aspergillus flavus* do BF<sub>s</sub> e BF<sub>Sm</sub> demonstraram que para a peptidase presente no BF<sub>s</sub> a temperatura ótima foi estimada em 55°C em valores absolutos, apresentando 32% de atividade em 70°C em comparação com o pico de atividade a 55°C. Em relação a peptidase presente no EE do BF<sub>Sm</sub>, a temperatura ótima foi determinada entre as temperaturas de 30 e 40°C, não apresentando diferença estatística significativa nesse intervalo (Two-way ANOVA  $P > 0,05$ ) com queda significativa acima de 40°C (**Figura 13**). Desta forma a temperatura intermediária foi selecionada como a ótima para o EE do BF<sub>Sm</sub>.



**Figura 13.** Determinação da temperatura ótima da peptidase presente no extrato enzimático produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus* no BFs e BFSm. Utilizando azocaseína como substrato em pH 5 e 7,5, respectivamente.

Como observado na **tabela 1** o perfil de inibição obtido nos EE de ambos os bioprocessos, nos sugerem algumas hipóteses de classes de peptidases obtidas.

No BFs observamos a inibição por duas classes de inibidores, o PMSF, inibidor de serino e o EDTA, inibidor de metalo. Para o PMSF observamos um percentual abaixo dos 50% de atividade relativa. Resultado semelhante foi observado para o EE do BFSm observando-se 78% de inibição pelo PMSF e 37% quando exposta ao EDTA comparado ao controle. Desta forma sugerindo a presença de uma serino peptidase e uma metalo peptidase em ambos EE.

No entanto, os resultados podem sugerir também a presença apenas de uma serino-peptidase dependente de metal, pois ocorreu uma menor inibição pelo EDTA.

Segundo Mellon; Cotty; Dowd, (2007) as duas classes de peptidases mais produzidas em BFSm por *Aspergillus flavus* são serino peptidases e metalo peptidases, isso corrobora nossos resultados. Observamos que não houve inibição pelo ácido Iodoacético, inibidor de cisteíno peptidase.

**Tabela 1.** Influência de inibidores sobre a atividade das peptidases produzidas através dos BFSm e BFs pelo fungo *Aspergillus flavus*. A atividade proteolítica foi determinada com o substrato azocaseína. Para o ensaio foi utilizado, tampão acetato pH 5 e 55°C e tampão Hepes pH 7,5 e 35°C para o BFs o e para o BFSm, respectivamente.

Inibidores	BFSm	BFs
	Atividade relativa (%)	Atividade relativa (%)
Controle	98,73 ± 1,3	98,91 ± 2,16
PMSF	22,27 ± 0,47	45,58 ± 1,90
EDTA	63,12 ± 0,69	60,41 ± 1,69
Ácido Iodoacético	102,60 ± 1,6	98,33 ± 2,54

#### 4.4 Purificação

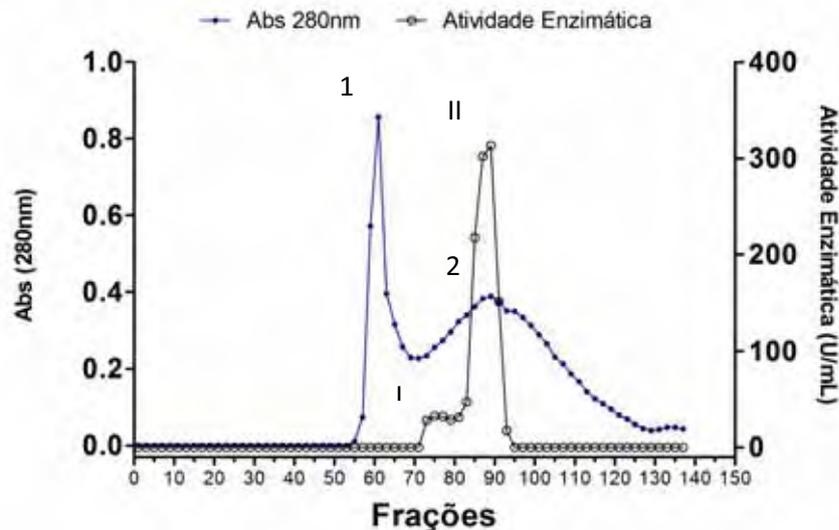
Para a determinação dos parâmetros bioquímicos, a peptidase proveniente do BFs, bioprocesso que apresentou maior produção, foi submetida a processos cromatográficos. A purificação da peptidase foi feita em apenas dois processos cromatográficos, reproduzíveis, apresentando rendimento de 17% e purificação de 248,2 vezes, como observado na Tabela 2.

Os valores obtidos do precipitado podem estar superestimados, pois no BFs o fungo *Aspergillus flavus* produz uma pigmentação, o que talvez explicasse o valor de 169,7 vezes observado na coluna de purificação. Hajji, Safia Kanoun e Gharsallah (2007) obtiveram com a purificação de uma serino-peptidase isolada do fungo *Aspergillus clavatus* ES1, um rendimento de 29 vezes, no entanto com um grau de purificação menor, de 7,5 vezes.

**Tabela 2.** Etapas de purificação da peptidase produzida no BFs, pelo fungo *Aspergillus flavus*.

Etapas	Atividade Total (U/mL)	Proteína Total (µg/mL)	Atividade Específica (U/mg)	Recuperação (%)	Purificação (vezes)
Extrato Fermentado	585,1	165,1	3543	100,0	1,0
Concentrado	3208,4	103,7	30943	73,7	8,7
Precipitado (Sephacryl S-100)	3674,3	6,1	601133	42,2	169,7
Dialisado	102,4	0,7	154654	39,2	43,6
Q-sepharose	77,2	0,6	140060	29,6	39,5
	295,7	0,3	879524	17,0	248,2

Na **Figura 14**, observamos o perfil de eluição da enzima na primeira etapa cromatográfica, onde detectamos dois picos com atividade proteolítica e dois picos com absorção em 280nm.



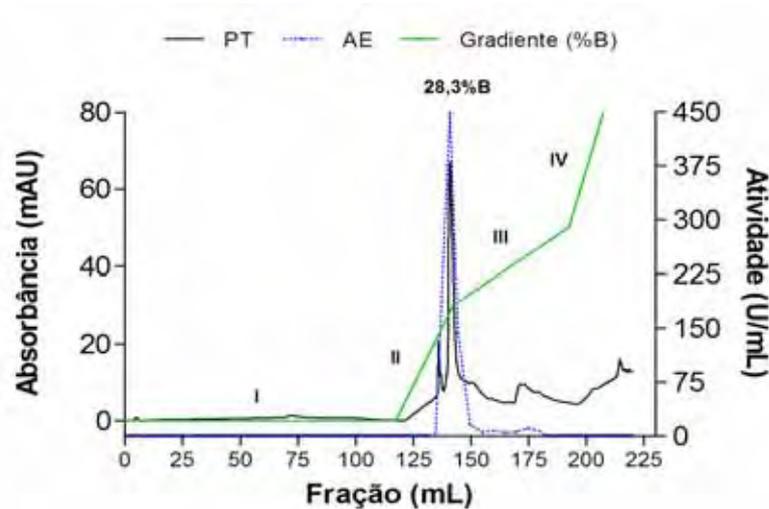
**Figura 14.** Perfil cromatográfico da eluição das proteínas, utilizando a resina Sephacryl S-100. A eluição das proteínas foi realizada em tampão bicine 20 mM pH 8,5 com 150 mM de NaCl. Foram coletados 5 mL por fração. O fluxo foi de 0,63mL/min. Ensaio realizado como descrito no item 3.4. Observamos dois picos de atividade enzimática e dois picos de absorbância, sendo observado a sobreposição do pico 2 absorbância e II atividade

O valor observado no pico 1 pode estar superestimado, porque também ocorreu a eluição do pigmento presente na amostra. No centro da eluição do pico 2 notamos que coincide os picos de absorbância em 280nm e atividade proteolítica. Assim as frações contendo atividade proteolítica do pico II foram reunidas e dialisadas em tampão Bicine 20 mM, pH 8,5 para serem submetidas à cromatografia de troca iônica, (Source 15 Q).

As amostras obtidas na cromatografia de exclusão de massa molecular, previamente dialisadas, foram submetidas à cromatografia de troca aniônica, utilizando a resina Source 15 Q que foi previamente empacotada em coluna Tricorn 10/50. A coluna foi equilibrada no tampão Bicine 20 mM, pH 8,5 e a eluição foi realizada com gradiente linear de tampão Bicine 20 mM, pH 8,5, contendo NaCl com variação de 0-200 mM. As frações coletadas foram novamente submetidas ao ensaio de atividade proteolítica como descrita no item 3.4.

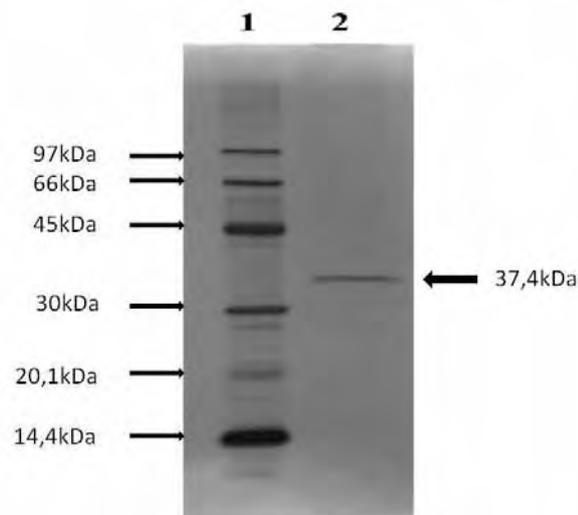
Como observamos no cromatograma deste segundo processo cromatográfico, **figura 15**, a purificação foi bem sucedida. Podemos observar o perfil

de atividade proteolítica em azul se sobrepondo ao perfil de proteína em preto. Foram obtidos três picos proteicos, mas apenas o pico 1 apresentou atividade enzimática. A purificação ocorreu com 28,5% do gradiente salino.



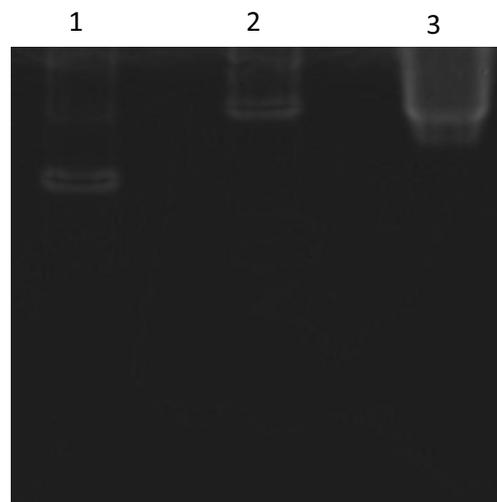
**Figura 15.** Perfil cromatográfico da eluição das proteínas provenientes da purificação de exclusão de massa, utilizando a resina aniônica Source 15Q com gradiente salino linear de 0 a 200mM de NaCl em tampão Bicine 20mM pH 8,5. PT- proteínas totais; AE- atividade enzimática.

As frações que apresentaram atividade foram avaliadas quanto ao seu grau de pureza por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante SDS/PAGE 12% (**Figura 16**)



**Figura 16.** Gel SDS-PAGE 12%. Canaleta 1: marcador de massa molecular, canaleta 2: peptidase purificada por troca iônica utilizando resina Source 15Q. O gel foi corado com nitrato de prata. Foto obtida do Gel Doc EZ Imager (Bio Rad).

A atividade gelatinolítica das amostras foi avaliada em zimograma co-polimerizado com gelatina. Observamos que as amostras de ambos os bioprocessos apresentaram atividade gelatinolítica, pois degradaram a malha do gel, como mostra a **Figura 17**.



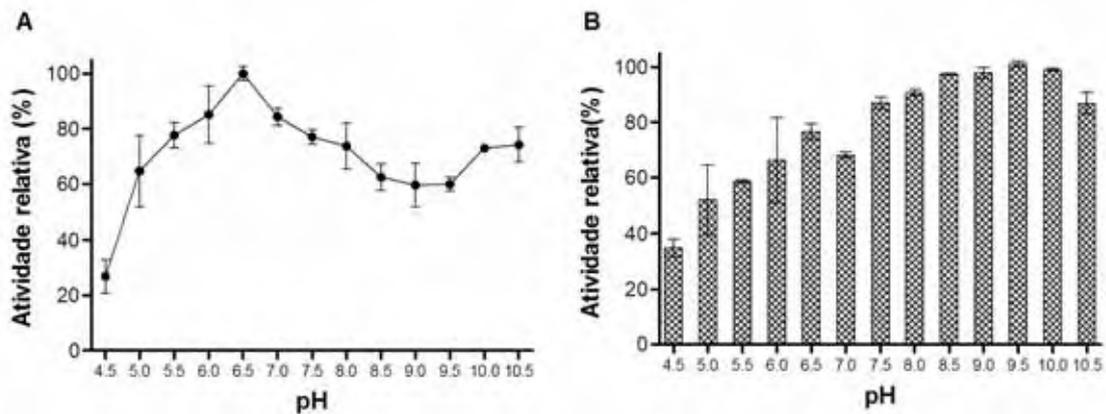
**Figura 17.** Zimograma co-polimerizado com gelatina para detecção de atividade colagenolítica das peptidases presentes nos extratos enzimáticos. Canaleta 1: EE do BFs, canaleta 2: EE do BFSm, canaleta 3: peptidase purificada. O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue G-250.

A peptidase produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* teve sua massa molar estimada em 37,4 kDa, conforme avaliada no *software* ImageLab 3.0. No zimograma podemos observar que as enzimas produzidas em ambos bioprocessos possuem atividade colagenolítica, pois houve degradação da gelatina na malha presente no gel. Segundo Mellon, Cotty, Dowd (2007) o fungo *Aspergillus flavus* produz diferentes classes de enzimas com essa característica.

#### 4.5 Caracterização bioquímica funcional

A caracterização bioquímica funcional da peptidase isolada fungo *Aspergillus flavus* foi realizada com substrato peptídico com supressão intramolecular de fluorescência Abz-KLRSSKQ-EDDnp. O perfil de atividade versus pH, revelou que a peptidase isolada do fungo *A. flavus* possui atividade catalítica relativa acima de 60% do pH 5 ao 9, e o máximo da atividade foi obtido no pH 6,5, (**Figura 18A**). O ligeiro aumento da atividade nos pH 10 e 10,5 se deve a possível degradação espontânea do substrato que ocorre em pH alcalino.

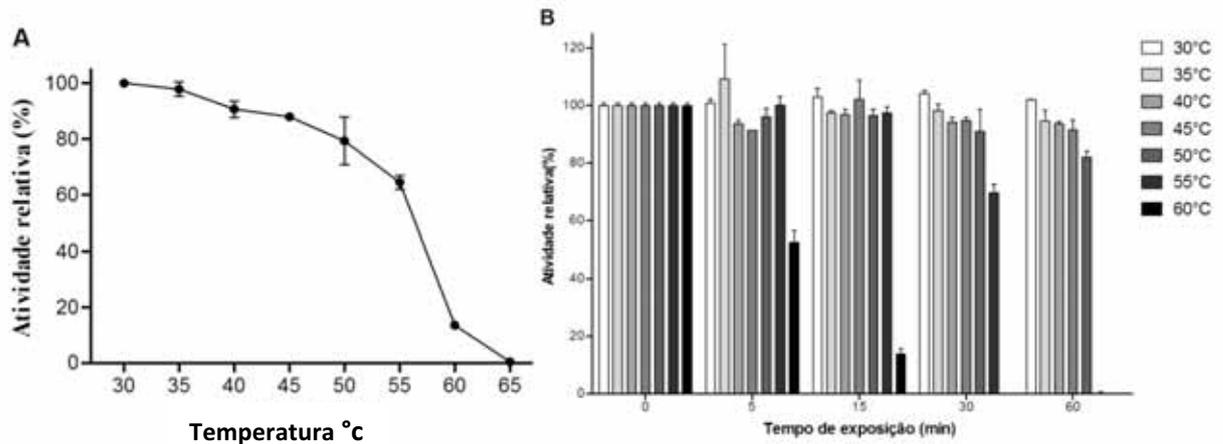
Na **Figura 18B** é possível observar a influência do pH sobre a estabilidade da peptidase. A peptidase purificada apresentou grande estabilidade quando exposta por 1 hora a diferentes valores de pH a 25°C. De uma forma geral a enzima apresentou maior estabilidade em valores de pH básicos, além disso observamos níveis acima de 60% de atividade relativa a partir do pH 6.



**Figura 18. (A)** Influência dos diferentes níveis de pH sobre a atividade proteolítica de peptidases purificada do fungo *Aspergillus flavus*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 40°C. **(B)** Estabilidade da peptidase purificada, do fungo *Aspergillus flavus*, frente à exposição a diferentes valores de pH. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 35°C, pH 6,5.

Após a determinação do pH ótimo e estabilidade, foi avaliado o efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica da peptidase isolada do fungo *A. flavus* em pH 6,5. A atividade foi realizada na faixa de temperatura de 25 a 65°C, e foi observado que para a faixa de temperatura entre 30 a 40°C se observou os maiores valores de atividade e nesta faixa não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA,  $p < 0,05$ ) sendo a temperatura ótima selecionada 35°C (**Figura 19A**).

No entanto, a peptidase apresentou 80% de atividade catalítica a 50 °C e acima de 55°C foi observado queda da atividade. A peptidase purificada apresentou grande estabilidade frente a exposição a diferentes tempos em diferentes faixas de temperatura. De uma forma geral a enzima manteve sua atividade quase que em 100%, exceto para as temperaturas de 55°C e 60°C onde se observa uma queda acentuada da atividade (**Figura 19B**).



**Figura 19. (A)** Influência da temperatura sobre a atividade proteolítica de peptidase purificada do fungo *Aspergillus flavus*. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, pH 6,5. **(B)** Influência da temperatura sobre a estabilidade da atividade proteolítica de peptidase purificada do fungo *Aspergillus flavus*. A atividade proteolítica foi determinada utilizando substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, pH 6,5.

O mecanismo de ação catalítica da peptidase isolada foi elucidado quando realizamos os ensaios enzimáticos utilizando os inibidores: PMSF, Quimostatina e Inibidor da Tripsina - inibidores de serino peptidase, Pepstatina- inibidor seletivo de peptidase ácida, EDTA- inibidor de metalo peptidase e E-64- inibidor de cisteíno peptidase. A peptidase foi fortemente inibida na presença dos inibidores PMSF e Quimostatina, o que sugere que a peptidase produzida por *Aspergillus flavus* pertença à classe de serino peptidases e mais especificamente, ao subgrupo *quimotripsina-like*, dada a sua inibição por Quimostatina (**Tabela 3**).

**Tabela 3.** Influência de inibidores sobre a atividade proteolítica de peptidases produzidas em BFs pelo fungo *Aspergillus flavus*. A atividade proteolítica determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 35°C, em pH 6,5.

Inibidores	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100 ± 2,6
Quimostatina	0,8 ± 0,7
PMSF	0,2 ± 0,2
Inibidor de Tripsina	87,8 ± 5,3
E-64	101,3 ± 2,4
Pepstatina	100,2 ± 2,5
EDTA	89,7 ± 4,4

Os íons podem interagir com resíduos que compõe o sítio catalítico de uma enzima, e neste caso levar a uma inativação que pode ser reversível ou irreversível.

Outra forma que os íons podem modular a atividade de uma enzima é interagir com resíduos de aminoácidos da superfície da enzima promovendo modificação na estrutura terciária que pode levar a modulações positivas (ativação), que neste caso seria o aumento da atividade ou modulações negativas (inativação) que é a diminuição da atividade proporcionando diferentes respostas.

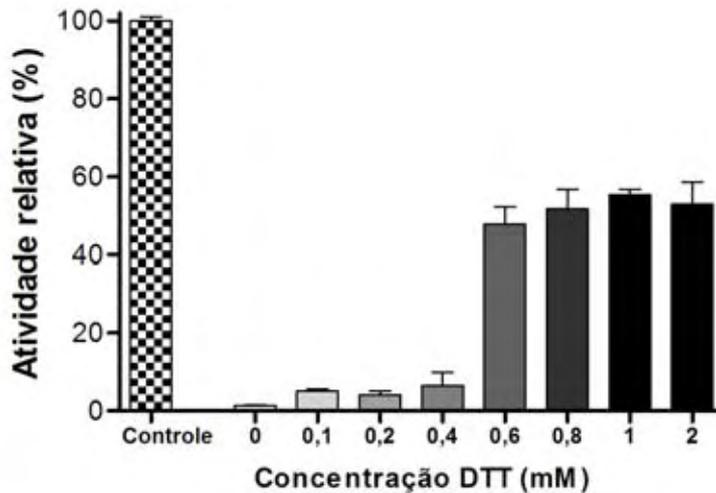
Na **tabela 4** a seguir, é possível observar que, nenhum dos íons estudados para esta peptidase promoveu aumento da atividade proteolítica, entretanto não houve perda da atividade significativa, exceto na presença do íon  $\text{Cu}^{+2}$  que causou 88,4% de perda da atividade (**Tabela 4**).

De maneira geral, as inativações não ultrapassaram 10%, ressalva para o lítio que promoveu a inativação da peptidase em 11,3%. É interessante observar que o íon  $\text{Al}^{+3}$  foi descrito por Clauberg e Joush (1993) como ativador de uma serino-peptidase em pH 6,5; fato semelhante foi observado por Hamin-Neto (2012) na produção de uma metalo peptidase pelo fungo *Eupenicillium javanicum*. Lupidi et al. (2002) também reportaram a modulação da atividade proteolítica de serino peptidase, no entanto, em nosso estudo não observamos modulação por esse íon na atividade enzimática (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Influência de íons metálicos sobre a atividade proteolítica de peptidase produzida em bioprocessamento sólido pelo fungo *Aspergillus flavus*. O ensaio foi determinado na presença do substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp a 35 °C em pH 6,5, a concentração final dos íons foi de 10mM.

Íons	Atividade proteolítica residual (%)
Controle	100,0 ± 2,5
Sódio	95,9 ± 1,1
Bário	96,9 ± 2,2
Cobalto	93,4 ± 0,7
Magnésio	93,9 ± 3,5
Cálcio	93,5 ± 2,5
Alumínio	91,3 ± 1,6
Zinco	96,7 ± 1,6
Níquel	96,6 ± 0,7
Manganês	91,2 ± 1,7
Potássio	96,7 ± 6,7
Lítio	88,7 ± 1,6
Cobre	11,6 ± 3,7

Na tentativa de elucidar ainda mais o conhecimento a respeito da peptidase purificada e analisando previamente os resultados obtidos com a inativação da peptidase quando exposta ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ , foi elaborado um ensaio para verificar se a inativação promovida pelo íon  $\text{Cu}^{2+}$  era reversível ou não (**Figura 20**).



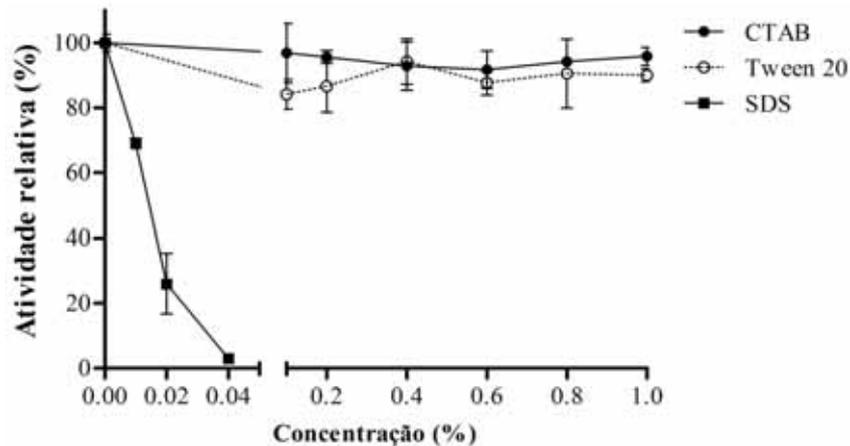
**Figura 20.** Efeito do DTT sob a ativação da peptidase purificada. A peptidase foi previamente inativa com íon  $\text{Cu}^{2+}$  sendo adicionadas concentrações crescentes de DTT. Ensaio realizado em pH 6,5 a 35 °C, utilizando o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp

Podemos observar que após inativação total da enzima com 1mM do íon  $\text{Cu}^{2+}$  e o aumento gradual da concentração do DTT revertermos a inativação em 50%, demonstrando que a inativação é reversível. Observa-se também que mesmo aumentando a concentração de DTT, a partir de 0,8mM não ocorre mudança na atividade relativa.

A **figura 21** mostra o efeito de surfactantes sobre a atividade da peptidase. É possível observar que o surfactante catiônico CTAB e o surfactante Tween 20<sup>®</sup> não afetaram a atividade da peptidase até a concentração de 1%. Entretanto, o surfactante aniônico SDS proporcionou queda da atividade da peptidase em baixas concentrações, muito provavelmente promovendo a desnaturação da enzima pelo rompimento de ligações hidrofóbicas.

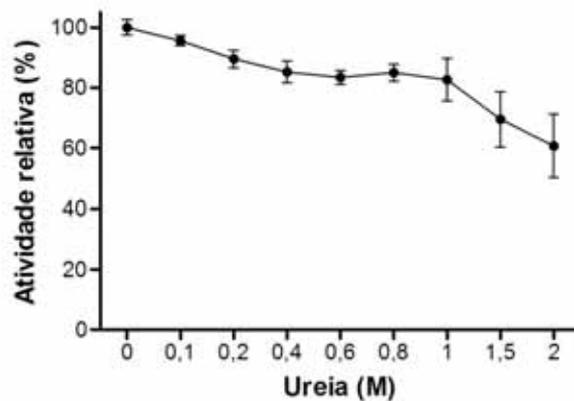
De acordo com Sampaio e Silva et al. (2011) é possível apontar a influência de surfactantes nas interações hidrofóbicas e, conseqüentemente, a interferência na

estrutura molecular da peptidase, promovendo a redução da atividade proteolítica.



**Figura 21.** Efeito dos surfactantes CTAB, Tween 20® e SDS sobre a atividade proteolítica de peptidase. A atividade proteolítica foi determinada com substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp em pH 6,5 a 35 °C.

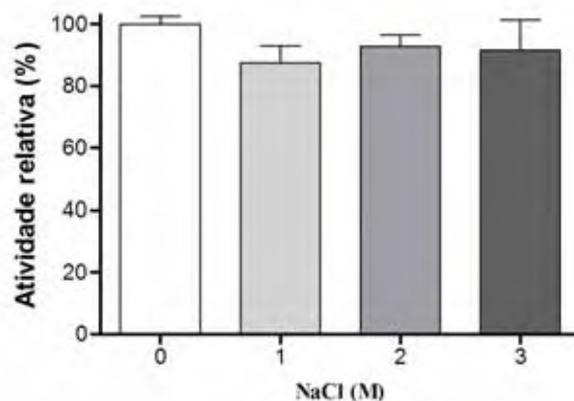
As peptidases podem se apresentar na forma ativa ou inativa, isto é desnaturada. Segundo Fonseca et.al (2006) a ureia é um agente cuja afinidade pela forma desnaturada da enzima fez com que inspirasse o termo caotrópico para designar esse tipo de agente desnaturante. Controverso a forma como esses agentes atuam, mas acredita-se que ocorra uma elevação na solubilidade dos grupos da peptidase na solução aquosa do desnaturante como também diminuindo a interação hidrofóbica da peptidase. O efeito da ureia na atividade da peptidase foi avaliado em diferentes concentrações molares e com o aumento da concentração de ureia houve um decréscimo da atividade proteolítica. Na concentração máxima estudada de 2 M de ureia, a peptidase manteve em 60% sua atividade proteolítica, (**Figura 22**).



**Figura 22.** Efeito da ureia sobre a atividade catalítica da peptidase purificada do fungo *A. flavus*. Ensaio realizado em pH 6,5 a 35 °C, utilizando o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

O fato da peptidase isolada do fungo *A. flavus* apresentar alta resistência à desnaturação, ou seja, com 2 M de ureia, a peptidase permanece com 60% sua atividade proteolítica, indica pouca quantidade de ligação de ponte de hidrogênio, o que confere a esta enzima uma maior tolerância na presença de ureia.

Quando realizamos a exposição da peptidase frente ao aumento da concentração de NaCl, a peptidase praticamente manteve sua atividade em 90% nas concentrações de 1, 2 e 3 M de NaCl (**Figura 23**).

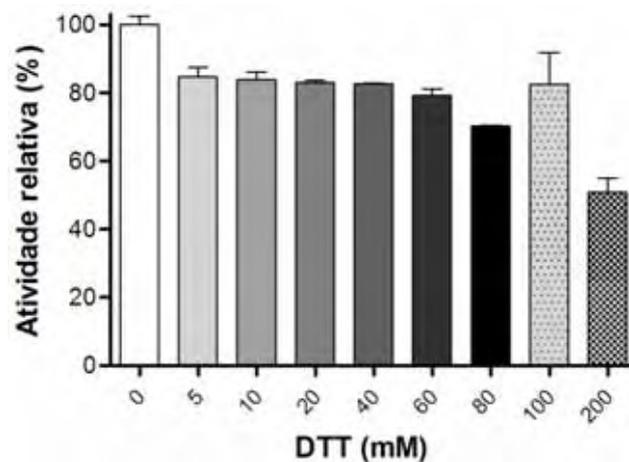


**Figura 23.** Efeito do NaCl sobre a atividade catalítica da peptidase purificada do fungo *A. flavus*. Ensaio realizado em pH 6,5 a 35 °C, utilizando o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Este fato pode sugerir que o aumento da concentração de NaCl não interfere na ligação e catálise do substrato no sítio catalítico da peptidase, o que proporcionou a atividade da enzima em concentrações elevadas de NaCl. Também podemos

inferir que a concentração de NaCl não foi suficiente para romper as ligações iônicas intramoleculares ou próximas do sítio catalítico, caso existam, o que proporcionou que a enzima mantivesse a atividade catalítica em 3 M NaCl (**Figura 23**).

Ditioneitol (DTT) é um agente redutor, que atua como agente desnaturante, reduzindo as ligações de ponte dissulfetos o que desestabiliza a estrutura das proteínas, ocasionando a queda na atividade catalítica. O efeito de DTT foi avaliado em concentrações molares crescentes, e com este aumento podemos observar que a atividade proteolítica da peptidase purificada foi caindo, indicando que ocorreu modificação estrutural promovida pelo DTT (**Figura 24**).



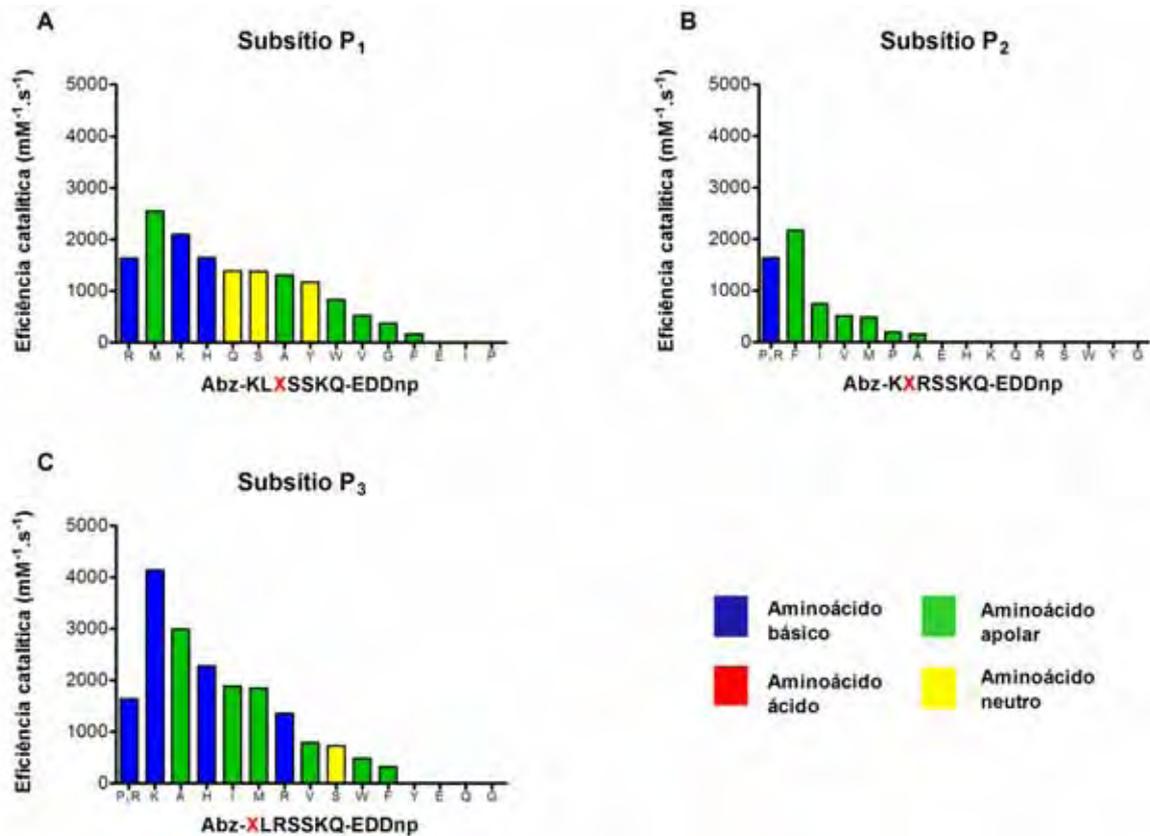
**Figura 24.** Efeito do DTT sobre a atividade catalítica da peptidase purificada do fungo *A. flavus*. Ensaio realizado em pH 6,5 a 35 °C, utilizando o substrato sintético Abz-KLRSSKQ-EDDnp.

Esta modificação pode ser o rompimento de ligação de ponte dissulfeto. Com 80 mM de DTT a atividade remanescente foi de 80 %, acima desta concentração, 200 mM a atividade remanescente foi de 50 %, (**Figura 24**).

#### 4.6 Estudos de cinética enzimática

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

ainda não foram determinados, desta forma, a preferência relatada nos resultados ainda é somente pelos valores obtidos dos parâmetros cinéticos. Na **figura 25** é possível observar os parâmetros cinéticos determinados para os subsítios S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>.



**Figura 25.** Representação da eficiência catalítica observada quando substituídos os aminoácidos nas regiões dos subsítios, lado não linha: **(A)** P<sub>1</sub>; **(B)** P<sub>2</sub> **(C)** P<sub>3</sub>.

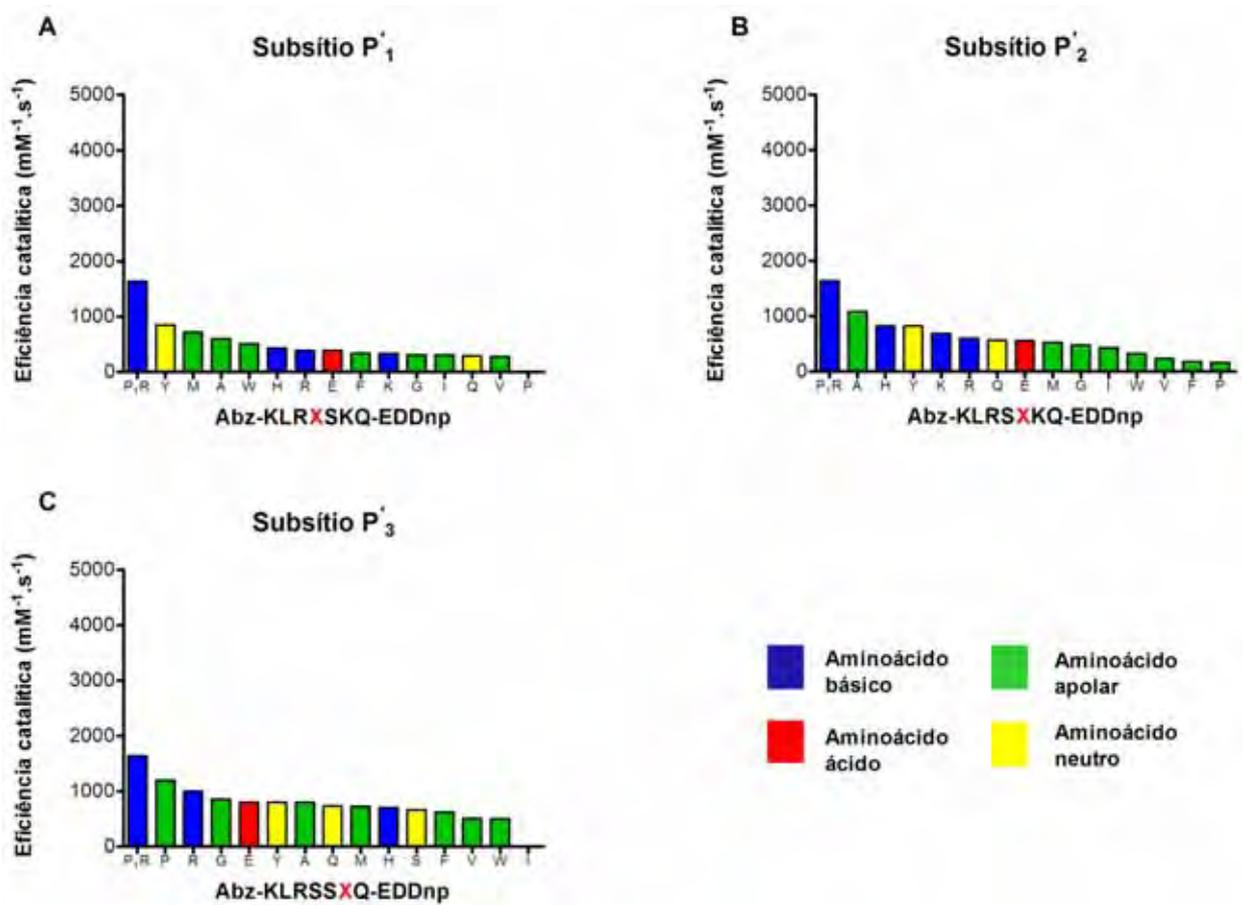
Os substratos com variações em P<sub>1</sub> mostraram-se mais favoráveis à hidrólise, conforme podemos observar pelos valores obtidos da eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ). O subsítio S<sub>1</sub>, apresentou maior preferência para substratos contendo aminoácidos básicos nesta posição, sendo a Lys, Arg e His os melhores substratos com 1551, 1.634 e 1.644 s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, e o aminoácido apolar Met 2.547 s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup> (**Tabela 5-Apêndice A**).

Entre os subsítios do lado não linha, ou seja, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub>, o S<sub>2</sub> foi o subsítio que apresentou maior seletividade, por aceitar somente substratos contendo aminoácido apolar nesta posição. Deste o que apresentou melhor hidrólise foi Phe, seguido da Ile, com 2.159 e 741 s<sup>-1</sup> mM<sup>-1</sup>, respectivamente. Vários substratos não

foram hidrolisados, como foi o caso para os substratos contendo His, Lys, Arg, que apresentaram hidrólise no subsítio anterior, ou seja,  $S_1$  (**Figura 25**).

Os maiores valores de  $k_{cat}/K_M$  do lado não linha foram obtidos para o subsítio  $S_3$ . O subsítio  $S_3$ , também apresentou uma discreta especificidade para substratos apolar e básico. O substrato contendo Lys foi o que apresentou maior valor de  $k_{cat}/K_M$ , com valor de  $4.139 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , seguido do substrato contendo Ala com  $k_{cat}/K_M$  de  $2.989 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , (**Figura 25**).

Na **figura 26** é possível observar os parâmetros cinéticos determinados para os subsítios  $S'_1$ ,  $S'_2$  e  $S'_3$ .



**Figura 26.** Representação da eficiência catalítica observada quando substituídos os aminoácidos nas regiões dos subsítios, lado linha: **(A)**  $P'_1$ ; **(B)**  $P'_2$  **(C)**  $P'_3$ .

O subsítio  $S'_1$ , apresentou os menores valores de  $k_{cat}/K_M$  para os substratos contendo mutações nesta posição. Este subsítio não apresentou especificidade, ou

seja, interação com diferentes tipos de aminoácidos, desta forma não regula a ação da enzima em termos de aceitar ou não o substrato, (**Figura 26**).

Para o subsítio  $S'_2$ , também foi observado que ocorreu a hidrólise de diferentes substratos, contendo aminoácidos apolar, polar, ácido e básico. O maior valor de eficiência catalítica foi para o substrato contendo Ala nesta posição,  $1.071 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ , (**Tabela 6-Apêndice B**). Nessa posição foi observada também a preferência para alguns aminoácidos apolares como a Phe, Ile, Val, Met e Pro da mesma forma que observamos para o subsítio  $S_2$ , entretanto apresentando valores de atividade catalítica menor.

O subsítio  $S'_3$  apresentou os maiores valores de  $k_{\text{cat}}/K_M$ , quando comparado aos subsítios  $S'_1$  e  $S'_2$ .

Um fato interessante que precisa ser confirmado com o ponto de hidrólise é o fato o peptídeo contendo Pro nesta posição ser o melhor substrato ( $1.199 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ ), (**Figura 25**) Graminho et al. (2012) obteve resultado semelhante para esse substrato com uma serino peptidase produzida pelo fungo *Penicillium waksmanii*.

Em geral os valores de  $K_M$  para os subsítios  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S'_1$ ,  $S'_2$  e  $S'_3$  foram baixos, destaque para o substrato contendo Met em  $P_1$ , cujo valor foi de  $0,000767 \text{ mM}$  (**Tabela 5-Apêndice A e Tabela 6-Apêndice B**). As maiores taxas de catálise ( $k_{\text{cat}}$ ) foram observadas para os substratos que possuem aminoácidos básicos, por exemplo,  $P_1$  His,  $P_1$  Arg,  $P_3$  His,  $P_3$  Lys e  $P'_2$  Arg.

**CONCLUSÃO**

## 5. CONCLUSÃO

---

O fungo *Aspergillus flavus* mostrou ser um bom produtor de peptidase sendo pouco exigente na etapa de produção. Em um curto período de tempo, com picos de produção em média de 96 horas e utilizando apenas como matéria prima, resíduo agroindustrial, no caso do BFs, foi gerado um produto em escala laboratorial. O apelo comercial para a reciclagem de resíduos agroindustriais faz com que a produção de um produto nobre, como uma enzima, tenha um valor agregado.

A peptidase obtida durante todo o processo é promissora, pois a etapa pós-produção, após padronização, não apresentou grandes dificuldades de execução, demandando apenas dois processos cromatográficos. O rendimento de 17% também foi satisfatório levando em consideração todas as perdas inerentes ao processo.

As peptidases presentes do EE de ambos bioprocessos apresentaram características diferentes em alguns pontos como, temperatura ótima e pH ótimo, mas foram semelhantes no que diz respeito as classes, sugerindo a presença de peptidases distintas nos bioprocessos.

A enzima proveniente do BFs que foi purificada, possui uma boa estabilidade à variação de temperatura e pH, além de ter mantido grande parte da atividade quando exposta a concentração crescente de sal e/ou agente redutor, além de ter mantido sua estabilidade quando exposta a surfactantes. Esses dados de uma forma geral nos dá um panorama de como é a estrutura da peptidase no seu todo e podemos sugerir a partir desses resultados que a peptidase possui poucas ligações iônicas e muitas ligações hidrofóbicas, além de possuir em sua estrutura possíveis pontes dissulfeto. Interessante salientar que a peptidase purificada possui atividade colagenolítica, como já descrita em outros trabalhos.

É de fundamental importância o conhecimento da especificidade das enzimas, pois através dessas informações é possível elaborar estratégias de uso, além de contribuir com o melhor entendimento na interação enzima/substrato.

A peptidase produzida neste trabalho apresentou alta especificidade para o lado não linha, ou seja, lado amino-terminal. No subsítio S<sub>2</sub> apresentou alta

especificidade para aminoácidos apolares e no mesmo subsítio, sentido linha ou carboxi-terminal, apresentou semelhante comportamento para alguns aminoácidos apolares, porém com valores de eficiência catalítica menor. Para o sentido linha a peptidase não apresentou especificidade para nenhum subsítio.

Assim como outros gêneros de *Aspergillus* a espécie *flavus* mostrou ser uma ferramenta biológica de grande utilidade para a biotecnologia.



## ***REFERÊNCIAS***

## 6. REFERÊNCIAS

---

- 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.
- AGUILAR, C.N. et al. **Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes**, American Journal of Biochemistry and Biotechnology, v.4, n.4, p. 354-366, 2008.
- ALEGRE, A. C. P. et al. Production of thermostable invertases by *Aspergillus caespitosus* under submerged or solid state fermentation using agroindustrial residues as carbon source. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 612-622, 2009.
- ALONSO, F. O. M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica*** (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado- Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.
- ARABI, M. I. E.; BAKRI, Y.; JAWHAR, M. Extracellular Xylanase Production by *Fusarium* species in Solid State Fermentation. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 3, p. 209–212, 2011.
- 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
- BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.
- 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.
- CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lípase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiogy**, v. 23, p. 60-67, 2006.
- COUTO, S.R; SANROMÁM, M. A. Effect of two wates from groundnut processing on laccase production and dye decolourisation ability. **Jornal of food engineering**, v.73, p. 388-393, 2006.
- CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **J Biol Chem**, v. 171, 501-505, 1947.
- 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.

CLAUBERG, M.; JOSHI, J. G. Regulation of serine protease activity by aluminum: Implications for Alzheimer disease. **Neurobiology**, v.90, p. 1009-1012, 1993.

CLEVELAND, T. E. et al. Potential of *Aspergillus flavus* genomics for applications in biotechnology. **Trends in Biotechnology**, vol.27, n .3, p. 151-157, 2009.

DARAH, I.; SUMATHI, G.; JAIN, K.; HONG, L.S. Involvement of Physical Parameters in Medium Improvement for Tannase Production by *Aspergillus niger*.

**DASH, C. et al.** Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. **Crit Rev Biochem Mol Biol.** v. 38, n.2, p.89-119, 2003.

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.

DUTT, K. et al. .Role of casein on induction and enhancement of production of a bacterial milk clotting protease from an indigenously isolated *Bacillus subtilis*. **Letters in Applied Microbiology** doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02324.x, 2007.

DUCROS, E.et al. Effect of aeration and agitation on the peptidase production by *Staphylococcus aureus* mutant RC128 in a stirred tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, p. 143-148, 2009.

FERREIRA JR,N.; BON, E.P.S.; FERRARA,M.A. **Tecnologia de bioprocesso**. In: Séries em Biotecnologia. Rio de Janeiro, 2008.

FONSECA, L.C. et al. Efeito da composição do solvente sobre a estabilidade de proteínas em soluções aquosas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 3, p. 543-548, 2006.

GRAMINHO, E.R. et al.Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. Appl Biochem Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-012-99743.

GRAHN, S.et al. Subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1431, p. 329-337, 1999.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, v.30, 136–145, 2007.

GONZÁLEZ-RÁBADE,N. et al. Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. **Biotechnology Advances**,v. 29, p. 983–996, 2011.

GOUDA, M.K. Otimization and purificationof alkaline proteases produced by Marine *Bacillus* sp. MIG newly isolated from Eastern Harbour of Alexandria. **Polish Journal of Microbiology**, v. 55, n.2, p.119-126, 2006.

GUPTA, R. et al. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

HAMIN-NETO, Y. A. A. **Fermentação, purificação, caracterização bioquímica e microencapsulação da protease produzida pelo fungo *Eupenicillium javanicum***. Dissertação (Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP) 2012, 60p.

HAJJI, M.; SAFIA KANOUN, M. N.; 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 & Social Sciences**, v. 2, p. 23-25, 2006.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v.153, p. 1677–1692, 2007.

IBRAHIM,A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A. Optimization of media and cultivation conditions for alkaline protease production by Alkaliphilic *Bacillus halodurans*. **Research Journal of Microbiology**, v. 4, n.7, p.251-259, 2009.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

KASANA, R.C.; SALWAN, R.; YADAV, S.K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 262-276, 2011. <http://dx.doi.org/10.3109/1040841X.2011.57702>.

KAVYA V, PADMAVATHI, T. Optimization of growth conditions for xylanase production by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Pol. J. Microbiol**, v.58, n , p-125-30, 2009.

KLEINER,D.E; STETLER-STEVENSON, W.G.Quantitative Zymography: Detection on Picogram quantities of gelatinases.**Analytical Biochemistry**, v. 218, p.325-329, 1994.

KRISHNA, C. Solid-State Fermentation Systems-An Overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 25, p.1–30.

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

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

LOTONG, N.; SUWANARIT, P. Production of Soy Sauce Koji Mold Spores Spore Inoculum in Plastic Bags. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1224 – 1226, 1983.

LUPIDI, G.et al. Aluminum modulation of proteolytic activities. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 228, p. 263-/269, 2002.

MACCHIONE, M. M.et al. Protease Production by Different Thermophilic Fungi. **Appl Biochem Biotechnol**, v.146, p.223–230, 2008.

MALLER, A.; DAMÁSIO, A.; DA SILVA,T.; JORGE, J.A.; TERENCE, H.; POLIZELI, M. Biotechnological Potencial of Agro-Industrial Wates as a Carbon Source to Thermostable Polygalacturonase Production in *Aspergillus niveus*. **Enzyme Research**, 2011. doi: 10.4061/2011/289206

MARTINS, E. S. et al. Solid state production of Thermostable pectinases from thermophilic *Thermoascus aurantiacus*. **Process Biochemistry**, v. 37, p. 949–954, 2002

MELLON, J.E.; COTTY, P.J.; DOWD, M.K. *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. **Appl Microbiol Biotechnol**,v.77, p.497–504, 2007.

MERHEB-DINI, C. et al. Biochemical and Functional Characterization of a Metalloprotease from the Thermophilic Fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 19, p. 9210 – 9217, 2009.

MEROPS *the peptidase database*. Disponível em: <http://merops.sanger.ac.uk/cgi-bin/famsum?family=T>. Acessado em 13 de abril de 2013.

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

MEHTA,V.J.; THUMAR, J.T.; SINGH, S.P. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. **Bioresour Technol**, v.97, p.1650-1654, 2006.

MOO-YOUNG, M.; MORIERA, A.R.; TENDERDY, R.P. Principles of solid state fermentation. In The filamentous fungi. **Fungal Biotechnology**, vol. 4p. 117-144, 1983.

ODA, K. New families of carboxyl peptidases: serine-carboxyl peptidases and glutamic peptidases. **Journal of biochemistry**, v. 151, nº 1, p. 13-25, 2012.

OLIVEIRA, A .K. **Análise dos elementos estruturais de metaloproteínas das classes P-I e P III do veneno de *Bothrops jararaca* importantes para sua**

**interações com proteínas plasmáticas e da matriz extracelular.** Dissertação (Mestrado, apresentada à Instituto Butantã/IPT) 2009, 130p.

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

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMATHI, J. Effect of fermentation conditions for the production of protease from rice mill wastes using *Aspergillus flavus*. **Advances in Biological Research**, v. 3, p.123-126, 2009.

PEREIRA Jr, N.; BON,E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos-** Escola de Química/UFRJ, 62p. 2008.

PEREIRA, M.M.G; CARVALHO, E.P; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **B. CEPPA**, v.20, n° 1, p. 141-156, 2002.

POLGÁR, L. The catalytic triad of serine peptidases. **Cell. Mol. Life Sci.** vol. 62, P.2161-2172, 2005.

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

RAJKUMAR, R.; KOTHILMOZHIAN, J.; RAMASAMY, R. Productions and Characterization of a Novel.Protease from *Bacillus* sp. RRM1 Under Solid State Fermentation. **J.Microbiol. Biotechnol**, v.21, n 6, p-627- 636, 2011.

RAO, M. B. et al. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **American Society for Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 597 – 635, 1998.

RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J. in: Methods in Enzymology Proteolytic Enzymes: Serine and Cysteine Peptidases. v. 244, p. 19–61, 1994.

RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J; BATEMAM, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.** v.40, p.343-350, 2012.

SAMPAIO E SILVA, T. A. et al. Purification and some properties of an extracellular acid protease from *Aspergillus clavatus*. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 27, p. 2491–2497, 2011.

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.

SANDHYA C, MADHAVAN NAMPOOTHIRI K, PANDEY A. Microbial enzymes and biotransformations. **The Human Press Inc**, v.17. p. 165–80, 2005.a

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

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

SANTOS, J. A. N. **Inibição e especificidade da Lb<sub>pro</sub> do vírus da febre aftosa**. 2009. 93f. . Tese (Doutorado)- Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

SHAN LU. et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, p. 2275-2279, 2002.

SHARMA, R.; KATOCH, M.; SRIVASTAVA, O.S.; QAZI, G.N. Approaches for refining heterologous protein production in filamentous fungi. **World J Microbiol Biotechnol** DOI 10.1007/s11274-009-0128-x, 2009.

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. et al. . Production and partial characterization of serine and metallo peptidases secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, no prelo.

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. et al. Characteristics of collagenolytic enzymes secreted by deuteromycete fungi *Aspergillus flavus*. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 135, n. 5, p. 447-451, 2003.

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

THUMAR, J.T.; SINGH, S.P. Secretion of an alkaline protease from a salt- tolerant and alkaliphilic, *Streptomyces clavuligerus* strain Mit-1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.766-772, 2007.

TURK, B. et al.. Bovine stefin C, a new member of the stefin family. **J. Biol. Chem.** v. 268, p.7323-7329, 1993.

VELLARD M. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. **Current Opinion in Biotechnology**, n. 14, p. 1-7, 2003

VISHWANATHA, K.S. et al. Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. **J Ind M. Bio**, v. 37, p.129–138, 2010.

WU, T.Y. et al. 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.

YOUNG-CHUL S. et al. Stabilization of papain and lysozyme for application to cosmetic products. **Biotechnology Letters**, n. 22, p. 137-140, 2000.

*APÊNDICE*

## Apêndice A

**Tabela 5.** Determinação dos parâmetros cinéticos da serino peptidase purificada do fungo *Aspergillus flavus* para os subsítios S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> e S<sub>3</sub> utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições nas posições P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, e P<sub>3</sub>. As condições das reações cinéticas foram a 35 °C em pH 6,5. Aminoácido: apolar (a); polar básico (b); polar neutro (c); polar ácido (d).

<b>Substrato P<sub>1</sub></b>	<b>k<sub>cat</sub> (s)</b>	<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> (s<sup>-1</sup>. mM<sup>-1</sup>)</b>
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634
Abz-KLMSSKQ-EDDnp (a)	1,954316	0,000767	2547
Abz-KLKSSKQ-EDDnp (b)	3,995245	0,002576	1551
Abz-KLHSSKQ-EDDnp (b)	8,746712	0,005319	1644
Abz-KLQSSKQ-EDDnp (c)	2,193933	0,001576	1393
Abz-KLSSSKQ-EDDnp (c)	3,649405	0,002640	1382
Abz-KLASSKQ-EDDnp (a)	3,066194	0,002349	1306
Abz-KLYSSKQ-EDDnp (c)	1,931641	0,001657	1166
Abz-KLWSSKQ-EDDnp (a)	1,447097	0,001745	829
Abz-KLVSSKQ-EDDnp (a)	0,909440	0,001738	523
Abz-KLGSSKQ-EDDnp (a)	2,007836	0,005378	373
Abz-KLFSSKQ-EDDnp (a)	1,261374	0,007693	164
Abz-KLESSKQ-EDDnp (d)	não hidrolisou		
Abz-KLISSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		
Abz-KLPSSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		
<b>Substrato P<sub>2</sub></b>	<b>k<sub>cat</sub> (s)</b>	<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> (s<sup>-1</sup>. mM<sup>-1</sup>)</b>
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634
Abz-KFRSSKQ-EDDnp (a)	3,496306	0,001620	2159
Abz-KIRSSKQ-EDDnp (a)	4,465490	0,006030	741
Abz-KVRSSKQ-EDDnp (a)	7,035292	0,013910	506
Abz-KMRSSKQ-EDDnp (a)	8,058719	0,016620	485
Abz-KPRSSKQ-EDDnp (a)	5,251956	0,027150	193
Abz-KARSSKQ-EDDnp (a)	3,944585	0,024875	159
Abz-KERSSKQ-EDDnp (d)	não hidrolisou		
Abz-KHRSSKQ-EDDnp (b)	não hidrolisou		
Abz-KKRSSKQ-EDDnp (b)	não hidrolisou		
Abz-KQRSSKQ-EDDnp (c)	não hidrolisou		
Abz-KRRSSKQ-EDDnp (b)	não hidrolisou		
Abz-KSRSSKQ-EDDnp (c)	não hidrolisou		
Abz-KWRSSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		
Abz-KYRSSKQ-EDDnp (c)	não hidrolisou		

<b>Substrato P<sub>3</sub></b>	<b>k<sub>cat</sub> (s)</b>	<b>K<sub>M</sub> (mM)</b>	<b>k<sub>cat</sub>/K<sub>M</sub> (s<sup>-1</sup> · mM<sup>-1</sup>)</b>
Abz-KGRSSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,448690	0,001558	4139
Abz-ALRSSKQ-EDDnp (a)	10,901906	0,003647	2989
Abz-HLRSSKQ-EDDnp (b)	8,163335	0,003610	2261
Abz-ILRSSKQ-EDDnp (a)	5,065797	0,002689	1884
Abz-MLRSSKQ-EDDnp (a)	4,208102	0,002292	1836
Abz-RLRSSKQ-EDDnp (b)	3,762574	0,002785	1351
Abz-VLRSSKQ-EDDnp (a)	2,312212	0,002936	788
Abz-SLRSSKQ-EDDnp (c)	5,668681	0,007826	724
Abz-WLRSSKQ-EDDnp (a)	1,769445	0,003654	484
Abz-FLRSSKQ-EDDnp (a)	1,796001	0,005580	322
Abz-YLRSSKQ-EDDnp (c)	não hidrolisou		
Abz-ELRSSKQ-EDDnp (d)	não hidrolisou		
Abz-QLRSSKQ-EDDnp (c)	não hidrolisou		
Abz-GLRSSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		

## Apêndice B

**Tabela 6.** Determinação dos parâmetros cinéticos da peptidase purificada do fungo *Aspergillus flavus* para os subsítios  $S_1$ ,  $S_2$  e  $S_3$  utilizando o substrato Abz-KLRSSKQ-EDDnp, com substituições nas posições  $P'_1$ ,  $P'_2$ , e  $P'_3$ . As condições das reações cinéticas foram a 35 °C em pH 6,5. Aminoácido: apolar (a); polar básico (b); polar neutro (c); polar ácido (d).

Substrato $P'_1$	$k_{cat}$ (s)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634
Abz-KLRYSKQ-EDDnp (c)	5,202930	0,006146	847
Abz-KLRMSKQ-EDDnp (a)	3,086826	0,004280	721
Abz-KLRASKQ-EDDnp (a)	4,248667	0,007274	584
Abz-KLRWSKQ-EDDnp (a)	2,706259	0,005333	507
Abz-KLRHSKQ-EDDnp (b)	4,798461	0,011155	430
Abz-KLRRSKQ-EDDnp (b)	4,498175	0,011500	391
Abz-KLRESKQ-EDDnp (d)	5,428513	0,014015	387
Abz-KLRFKQ-EDDnp (a)	1,886087	0,005585	338
Abz-KLRKSKQ-EDDnp (b)	2,825924	0,008577	329
Abz-KLRGSKQ-EDDnp (a)	4,665682	0,014980	311
Abz-KLRISKQ-EDDnp (a)	1,717968	0,005599	307
Abz-KLRQSKQ-EDDnp (c)	2,065034	0,007670	269
Abz-KLRVSKQ-EDDnp (a)	1,186440	0,004373	271
Abz-KLRPSKQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		0
Substrato $P'_2$	$k_{cat}$ (s)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634
Abz-KLRSAKQ-EDDnp (a)	4,241807	0,003961	1071
Abz-KLRSHKQ-EDDnp (b)	4,179299	0,005074	824
Abz-KLRSYKQ-EDDnp (c)	4,663639	0,005723	815
Abz-KLRSKKQ-EDDnp (b)	7,703781	0,011335	680
Abz-KLRSRKQ-EDDnp (b)	4,056120	0,006869	591
Abz-KLRSEQKQ-EDDnp (c)	2,500552	0,004447	562
Abz-KLRSEKQ-EDDnp (d)	2,430077	0,004346	559
Abz-KLRSMKQ-EDDnp (a)	2,632311	0,005054	521
Abz-KLRSGKQ-EDDnp (a)	3,090912	0,006497	476
Abz-KLRSIKQ-EDDnp (a)	2,376760	0,005529	430
Abz-KLRSWKQ-EDDnp (a)	1,977399	0,006400	309
Abz-KLRSVKQ-EDDnp (a)	1,772305	0,007608	233
Abz-KLRSEKQ-EDDnp (a)	0,716603	0,004045	177
Abz-KLRSPKQ-EDDnp (a)	2,842511	0,017210	165
Substrato $P'_3$	$k_{cat}$ (s)	$K_M$ (mM)	$k_{cat}/K_M$ ( $s^{-1} \cdot mM^{-1}$ )
Abz-KLRSSKQ-EDDnp (b)	6,322366	0,003870	1634

Abz-KLRSSPQ-EDDnp (a)	7,252240	0,006049	1199
Abz-KLRSSRQ-EDDnp (b)	3,748275	0,003735	1004
Abz-KLRSSGQ-EDDnp (a)	7,083656	0,008295	854
Abz-KLRSSEQ-EDDnp (d)	2,250109	0,002818	798
Abz-KLRSSYQ-EDDnp (c)	2,739556	0,003470	789
Abz-KLRSSAQ-EDDnp (a)	3,906793	0,004925	793
Abz-KLRSSQQ-EDDnp (c)	1,453225	0,002008	724
Abz-KLRSSMQ-EDDnp (a)	1,735331	0,002436	712
Abz-KLRSSHQ-EDDnp (b)	1,543107	0,002205	700
Abz-KLRSSSQ-EDDnp (c)	2,094041	0,003269	641
Abz-KLRSSFQ-EDDnp (a)	4,577843	0,007350	623
Abz-KLRSSVQ-EDDnp (a)	1,707345	0,003354	509
Abz-KLRSSWQ-EDDnp (a)	3,346258	0,006779	494
Abz-KLRSSIQ-EDDnp (a)	não hidrolisou		