

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FFCLRP - DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

**“Estudo comparativo das proteases do
Complexo Torula-Humicola”.**

Tatiane Beltramini

Prof. Dr. João Atílio Jorge

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da USP, como
parte das exigências para a obtenção do título de
Mestre em Ciências, Área: Biologia Comparada.

RIBEIRÃO PRETO - SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Beltramini, T.

Estudo comparativo das proteases dos fungos do Complexo Torula-Humicola

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Biologia Comparada.

Orientador: Jorge, João Atílio

1. Complexo Torula-Humicola 2. proteases 3. termofílico

Capa: Foto do cultivo de *Agaricus bisporus*.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a chance todos os dias de poder acordar, sorrir e ter força para continuar mesmo quando parecia impossível.

Ao homem mais honesto e batalhador que conheço meu pai que mesmo em horas de muita tristeza e desespero buscou forças para continuar vivendo e que em nenhum segundo da vida desistiu de criar duas meninas além de sorrir das dificuldades sempre.

A meus avós Joanna e Osvaldo, meus anjos da guarda que zelam por mim em todos os momentos da minha vida, pessoas em que me apoio e me baseio todos os dias, meu alicerce e presente de Deus.

A Silvia (mãedrastra) que às vezes errando, sei que sempre tentou acertar, alguém que admiro pela paciência, perseverança e que me ensinou: “Na vida tudo passa, só Deus não muda, a paciência tudo alcança. Quem tem Deus, nada falta só Deus basta! Não esqueci de que devo investir em pessoas que fazem meu olho brilhar e que me deixam com uma “energia” diferente, mesmo não parecendo, sempre pensei nisso!

Aos amores da minha vida, minhas irmãs: Taiane (Taiovisk), Lúcinha (minha eterna Nena) e Julia (Jujú). Amigas, irmãs, cúmplices, filhas (quem mandou ser a mais velha né!?) pessoinhas que amo incondicionalmente, que fazem da minha vida colorida se eu pudesse daria uma cor pra cada uma delas: Taiane (amarelo), não é pelo mau humorzinho ...é pela luz!, Lucinha (rosa) pela delicadeza está sempre pronta a ajudar e a amar independente de quem e Júlia para você minha caçulinha, dou o arco-íris, serelepe, amiga, brincalhona sabe mesmo como colocar o pai no bolso.

A minha mãe Telma, que convivi poucos anos de minha vida, mas que me ensinou a nunca desistir, não importa o tamanho do problema que enfrentamos sorrir e confiar em Deus é sempre a melhor solução, mulher de fibra, guerreira que nunca se deixou abater.

A minha tia Tânia, exemplo de inteligência, dedicação, desde pequena toda vez que eu pensei: O que quero ser quando eu crescer? A resposta sempre foi: Igual à Tia Tânia. A essa pessoa devo o gosto de estudar, o amor pela pesquisa, o pensar posso sempre me superar. Amo muito, e um dia quando eu crescer, quero ser igual a você, viu!?! Alguém que não é só Tia é madrinha, amiga e é mãe, alguém que sempre esta comigo, no médico ou até mesmo naquele segredo mais secreto, alguém que me ensinou que: “Sou diferente dos outros, por isso, mesmo que os outros façam errado eu farei certo, pois não quero nunca ser igual a eles”.

A meu Tio Haroldo, homem batalhador, que mesmo diante de muitas dificuldades quando mais jovem soube seguir o caminho certo, o responsável pela família mais linda que eu conheço.

A meus primos Nayana e Peterson pessoas que estão em meu coração, não importa a distância Trancoso ou Londres, aprendi com vocês que nunca devo ter preconceito antes de realmente conhecer, que o valor das coisas não está no quanto custam, no dinheiro, e sim no viver, em um sorriso, em uma batida de coração em uma onda do mar... Aprendi também a não cumprimentar quem eu penso que conheço, nem quem vocês pensam que conhecem porque afinal de contas, o Universo é paralelo!

A meus primos Rudson e Nickson os meninos mais lindos e especiais do mundo! Rudson sempre meu cúmplice, não importa quantos quatrocentos reais emprestasse ou quantos segredos doidos tivesse que guardar, fiel escudeiro! Nickson criança, doce, esperta e inteligente diz que vai ser doutor, mas o nome não engana é de presidente!

A minha avó Neuza, meu Tio Fábio e Tia Claudia com vocês pude perceber que ser feliz está na simplicidade das coisas, em um almoço de domingo, em uma plantinha no quintal e que muitas vezes não saber expressar o amor não quer dizer que não se ama e que a tranquilidade que precisamos para viver tem que ser buscada dentro de nós mesmos.

Quando se sonha sozinho, é apenas um sonho. Quando sonhamos juntos, é o começo da realidade (D. Quixote). A minha família obrigada por sonharem sempre comigo, a vocês devo tudo o que sou e só por vocês hoje a minha dissertação é realidade!

Meu carinhoso agradecimento ao Prof. Dr. João Atílio Jorge, pela orientação, confiança, paciência, oportunidade para realização deste trabalho e dedicação. Não só um orientador, um pai, que a qualquer hora que precisei sempre esteve ali com toda a disposição para me ajudar. Que nunca desistiu e não vai descansar até fazer de mim uma cientista!

Aos Profs. Dr. Héctor Francisco Terenzi, Dr. Luiz Henrique Souza Guimarães e Prfa. Dra. Maria de Lourdes T. M. Polizeli pela colaboração, boa vontade, conhecimento compartilhado e pela infra-estrutura oferecida.

A amiga Marita, por toda a amizade e paciência. Alguém que admiro muito, por sua garra dedicação, sempre sorrindo enfrenta todas as dificuldades. Pessoa que esta sempre

disposta a me ensinar, a conversar em qualquer momento hora ou lugar. Existe uma frase muito bonita que me faz lembrar nossa amizade: “Muitas pessoas irão entrar e sair da sua vida, mas somente verdadeiros amigos deixarão pegadas no seu coração” (Fabiano Lustosa) Tenha certeza, todos os dias você deixa uma pegadinha em mim. Obrigada por tudo!

Aos amigos Heloísa (Loli) (pelas UTIS e tardes cobertas de sorvete), Jean (são tantas emoções!), Bruna (pelas revelações do horário do almoço) Cynthia (“Amiga, com você aprendi que chorar é sinônimo de superação e ao contrário do que certa música diz Grandes mulheres choram sim!” Estarei sempre aqui pra você!), Simone (Sempre disponível a ajudar, revisando relatório, sugerindo idéias e discutindo experimentos, além das idéias mais engraçadas e malvadas de como se vingar de alguém que nos fez sofrer! “Salve-se os cabelos compridos, quem ainda os têm!”) Vivian, André, Alexandre (Maller), Michele, Ana (Vici), Tony (Berabita), Fernanda, Juliana, Rose, Magal, Vitor e Alan e agregados da química César e Flávio, pessoal da iniciação científica Marielle, Alana, Tida, Gabriel, Mayuí, Guilherme, Ivan, a todos vocês obrigada pelas risadas, momentos de descontração, conversar, sou muito grata por fazerem parte do meu dia a dia.

Aos amigos que já seguiram seus caminhos Alexandre Sonera, Giovana, Vanessa, Fabrício pessoas maravilhosas que me acolheram e me ensinaram muito no início da minha iniciação científica no laboratório.

Agradeço muito aos funcionários e colegas Ricardo (Fessor) e Maurício que me dedicaram o suporte técnico necessário e fundamental à realização deste estudo.

As minhas amigas queridas Erna, Régia, Carlinha, Denise, Gabriela, Cristiane (Crisoca), Catharina e Camile sem vocês não sei o que teria sido de mim, sempre dispostas a escutar todas as doideças que eu falo, amigas, confidentes, pessoas mais lindas que conheço! Deus me abençoou o dia que conheci cada uma.

Agradeço imensamente a Renata Andrade, secretária da Pós-Graduação da Biologia Comparada e sua ajudante Vera, pela paciência, eficiência e disponibilidade de ajudar. Meus agradecimentos também às funcionárias Sônia e Inês da seção de Pós-Graduação, sempre amáveis! Aos funcionários da secretaria do Departamento de Biologia Mirian, Isabel e Carlos pela atenção e prontidão em solucionar dúvidas.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Muito obrigada!

A vida me ensinou...

A dizer adeus às pessoas que amo,

Sem tirá-las do meu coração;

Sorrir às pessoas que não gostam de mim,

Para mostrá-las que sou diferente do que elas pensam;

Fazer de conta que tudo está bem quando isso não é verdade,

Para que eu possa acreditar que tudo vai mudar;

Calar-me para ouvir;

Aprender com meus erros.

Afinal eu posso ser sempre melhor.

A lutar contra as injustiças;

Sorrir quando o que mais desejo é gritar todas as minhas dores para o mundo,

A ser forte quando os que amo estão com problemas;

Ser carinhosa com todos que precisam do meu carinho;

Ouvir a todos que só precisam desabafar;

Amar aos que me machucam ou querem fazer de mim depósito de suas frustrações e

desafetos;

Perdoar incondicionalmente,

Pois já precisei desse perdão;

Amar incondicionalmente,

Pois também preciso desse amor;

A alegrar a quem precisa;

A pedir perdão;

A sonhar acordada;

A acordar para a realidade (sempre que fosse necessário);

A aproveitar cada instante de felicidade;

A chorar de saudade sem vergonha de demonstrar

Me ensinou a ter olhos para "ver e ouvir estrelas", embora nem sempre consiga entendê-las;

A ver o encanto do pôr-do-sol;

A sentir a dor do adeus e do que se acaba, sempre lutando para preservar tudo o que é importante para a felicidade do meu ser;

A abrir minhas janelas para o amor;

A não temer o futuro;

Me ensinou e esta me ensinando a aproveitar o presente, como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesma tenha que lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.

Fênix Faustine

Índice Geral

Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	X
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	XI
Resumo/Summary.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1 Proteases.....	1
1.2 Classificação das proteases.....	1
1.3 Importância Fisiológica das proteases nos seres vivos.....	5
1.4 Características das proteases produzidas por microrganismo.....	6
1.5 Aplicação das proteases.....	9
1.6 Termofilia.....	10
1.7 Complexo Torula-Humicola.....	11
1.8 Organismos de estudo.....	12
1.8.1 <i>Humicola grisea var. thermoídea</i>	13
1.8.2 <i>Humicola insolens</i>	13
1.8.3 <i>Scytalidium thermophilum</i>	14
2. Objetivo.....	16
2.1 Etapas Específicas.....	16
3. Material e Métodos.....	17

3.1 Linhagens utilizadas.....	17
3.2 Condições de crescimento.....	17
3.2.1 Manutenção da linhagem em meio sólido.....	17
3.2.2 Meio líquido.....	18
3.3 Obtenção dos conídios.....	18
3.4 Crescimento em meio líquido.....	18
3.5 Obtenção da massa micelial e do meio de cultura.....	19
3.6 Determinação das atividades enzimáticas.....	19
3.6.1 Preparo do substrato.....	19
3.6.2 Protease.....	20
3.7 Quantificação de açúcares em meio de cultura.....	20
3.8 Determinação quantitativa de proteínas.....	21
3.9 Determinação das propriedades bioquímicas das proteases.....	21
3.9.1 Determinação da temperatura e pH ótimos.....	21
3.9.2 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	21
3.9.3 Tempo de estabilidade a pHs extremos.....	22
3.10 Influência de diferentes compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das proteases extracelulares.....	22
3.11 Determinação das diferentes proteases produzidas pelos microrganismos.....	22
3.11.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturante (PAGE).....	22
3.12 Tratamento de dados.....	23

4. Resultados.....	24
4.1 Padronização do Meio de Cultivo.....	24
4.1.1 Variabilidade da composição do meio de cultivo: Fontes de Carbono	24
4.1.2 Efeito da concentração do extrato de levedura na produção de protease.....	30
4.1.3 Determinação da melhor concentração de glicose.....	32
4.2 Determinação do melhor tempo de cultivo para a produção de protease.....	34
4.3 Determinação da temperatura e pH ótimo de reação.....	36
4.4 Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH.....	39
4.5 Determinação do tempo de estabilidade a pHs extremos.....	43
4.6 Influência de íons, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das proteases extracelulares brutas.....	46
4.7 Diferenciação dos microrganismos através de zimograma.....	54
5. Discussão.....	57
6. Referências Bibliográficas.....	77

Lista de Figuras

Figura 01: Classificação das proteases.....	4
Figura 02: Efeito da suplementação com extrato de levedura no meio de cultura.....	31
Figura 03: Efeito da suplementação com glicose no meio de cultura.....	33
Figura 04: Determinação do tempo de cultivo.....	35
Figura 05: Determinação da temperatura de ensaio enzimático para amostra bruta.....	37
Figura 06: Determinação do pH de ensaio enzimático para amostra bruta.....	38
Figura 07: Determinação da termoestabilidade da amostra bruta.....	41
Figura 08: Determinação da estabilidade ao pH da amostra bruta.....	42
Figura 09: Determinação do tempo de estabilidade das proteases a pHs extremos em tampão Mc Ilvaine.....	44
Figura 10: Determinação do tempo de estabilidade das proteases a pHs extremos em tampão Ácido Bórico.....	45
Figura 11: Determinação da concentração ótima do íon Ca^{2+} na atividade proteásica.....	52
Figura 12: Determinação da concentração ótima do íon Mg^{2+} na atividade proteásica.....	53
Figura 13: Determinação das proteases produzidas pelos fungos pós PAGE e atividade.....	55
Figura 14: Sobreposição das proteases produzidas pelos fungos pós PAGE e atividade.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 01: Características das proteases produzidas por microrganismos.....	8
Tabela 02: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de <i>Humicola insolens</i>	27
Tabela 03: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de <i>Humicola grisea var. thermoídea</i>	28
Tabela 04: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de <i>Scytalidium thermophilum</i>	29
Tabela 05: Efeito de íons, EDTA e β -mercaptoetanol na concentração de 1 mM nos níveis de atividade proteásica.....	49
Tabela 06: Efeito de íons, EDTA e β -mercaptoetanol na concentração de 10 mM nos níveis de atividade proteásica.....	50
Tabela 07: Efeito da mistura de efetores na concentração de 1 mM nos níveis de atividade proteásica.....	51

Lista de Abreviaturas e Símbolos

μ: micra	h: horas
μg: micrograma	M: molar
μm: micrômetro	mA: miliamper
μmol: micromol	mg: miligrama
β: beta	min: minutos
3,4- DCI: 3,4-dicloroisocomarina	ml: mililitro
atm: atmosfera	mm: milímetro
BSA: albumina de soro bovino	mM: milimolar
cm: centímetros	nm: nanômetros
DAN: diazoacetil-DL-norleucina metilester	°C: grau Cécius
DFP: di-isopropilfluorofosfato	PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico	PCMB: p-cloromercuriobenzoato
E.64: L-3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano	PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto
EDTA: ácido etilenodiamino tetraacético	rpm: rotações por minuto
EPNP: 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi)propano	S.P: São Paulo
g: gramas	T.C.A: ácido tricloroacético
g: gravidade	U: unidades
	V: volt
	YpSs: Yeast-starch Agar (meio de cultivo com ágar e amido solúvel)

RESUMO

Proteases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos e sua função é clivar proteínas liberando peptídeos e aminoácidos. Proteases microbiais estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas conhecidas, e são estudadas extensivamente desde o advento da enzimologia. Proteases são um dos três maiores grupos de enzimas industriais, e representam aproximadamente 60% das enzimas comercializadas no mundo. Elas tem numerosas aplicações na produção industrial de diferentes itens, incluindo detergente, alimentos, remédios, couro e reagentes para diagnósticos.

Recentemente, as enzimas produzidas por microrganismos termofílicos têm atraído considerável atenção, devido a sua excelente resistência térmica e potencial biotecnológico.

O objetivo deste trabalho foi estudar a produção e propriedades bioquímicas das proteases dos fungos termofílicos: *Humicola grisea var. thermoidea*, *Humicola insolens* e *Scytalidium thermophilum*. Esses fungos foram classificados por poucos micologistas em um grupo denominado Complexo Torula-Humicola. Estes pesquisadores postularam que *H. grisea var. thermoidea*, *H. insolens* e *S. thermophilum* eram o mesmo organismo, que exibia diferentes fenótipos morfológicos quando crescido em diferentes meios de cultura.

Entretanto várias evidências em nosso laboratório mostraram que estes fungos exibiam diferenças morfológicas significantes mesmo após crescidos nas mesmas condições físicas e no mesmo meio de cultura. Deste modo, um objetivo secundário deste trabalho foi analisar se as proteases poderiam ser utilizadas como uma ferramenta rápida e fácil para distinguir os três fungos.

Independente da linhagem utilizada a maior produção de atividade da protease extracelular ocorreu quando 1,5% de glicose foi oferecido como fonte de carbono. Altos níveis de protease extracelular ocorreram após 48, 72 e 96 h de crescimento para *H. grisea var. thermoidea*, *H. insolens* e *S. thermophilum*,

respectivamente. Glicose em concentrações acima de 1,5% diminui drasticamente a produção de protease. A concentração de extrato de levedura revelou-se também um importante fator para a máxima produção de protease extracelular para os três microrganismos estudados, com altos níveis produzidos na presença de 0,4% de extrato de levedura.

Para os três organismos estudados, a atividade proteolítica máxima ocorre quando os níveis de glicose no meio de cultura são drasticamente diminuídos. Curiosamente, bons níveis de protease extracelular foram alcançados quando material celulósico foi oferecido como principal fonte de carbono, enquanto caseína foi uma fonte de carbono pobre para a produção de proteases. Esses dados sugerem que as proteases não foram induzidas por hidrólises de uma proteína exógena, oferecida simplesmente como fonte de carbono. Talvez as proteases produzidas na presença de glicose ou no meio de cultura contendo celulose estariam relacionadas com processos de diferenciação celular. Entretanto, está claro que as enzimas estão sob repressão catabólica, desde que em todas as linhagens altos níveis de proteases foram encontrados após uma drástica redução nos níveis de glicose.

O pH ótimo para a atividade proteolítica foi 8.0, 8.5 e 7.0 para *H. insolens*, *H. grisea var. thermoidea* e *S. thermophilum*, respectivamente. As proteases dos três fungos exibiram máxima atividade a 50°C. As enzimas de *S. thermophilum* e *H. insolens* foram estáveis até 50°C, com meia-vidas de 20 min e 11 min a 55°C, respectivamente. A atividade proteolítica de *H. grisea var. thermoidea* foi estável até 55°C, e exibiu meia vida de 20 min a 60°C. Em pHs extremos (3 e 11), as proteases produzidas pelas três linhagens se mostraram com boa estabilidade, mesmo quando incubadas por 6 horas.

As enzimas de *H. insolens* e *S. thermophilum* foram significativamente ativadas por cálcio, magnésio e β -mercaptoetanol. Em contraste estes efetores não influenciaram a atividade de *H. grisea var. thermoidea*. A presença da mistura de efetores no meio de reação resultou no decréscimo da atividade para as enzimas de *H. insoles* e *S. thermophilum*, comparados aqueles estimados para cada íons

sozinho. Estes dados sugerem que cálcio e magnésio competem por um único sítio de ligação.

Estudos de Zimograma ou análise por detecção da atividade da protease em fatias de gel após PAGE mostraram que cada uma das três linhagens produziam três principais proteases. Os perfis qualitativos das atividades das bandas/picos foram muito similares para o extrato bruto de *H. grisea var. thermoídea* e *H. insolens*. Entretanto, existiram diferenças na quantidade relativa de cada protease entre as duas linhagens de *Humicola*.

Comparativamente, *S. thermophilum* produz uma protease com rápida migração em PAGE e apresentou apenas vestígios de uma protease correspondente as principais proteases presentes no extrato bruto de ambas as linhagens de *Humicola*. Estes achados sugerem que os zimogramas de extrato bruto extracelulares para as linhagens termofílicas *H. grisea var. thermoídea*, *H. insolens* e *S. thermophilum* podem ser muito úteis para distinguir os três fungos usando um procedimento simples.

SUMARY

Proteases are enzymes largely distributed in the organisms and their function is to cleave proteins, releasing peptides and amino acids. Microbial proteases are among the most important hydrolytic enzymes known, and have been studied extensively since the advent of the enzymology. These proteases represent one of the three largest groups of industrial enzymes, and account for approximately 60% of the total enzyme sales in the world. They have numerous applications in the industrial production of different items, including detergents, foods, pharmaceuticals, leathers and diagnostic reagents.

Recently, the enzymes produced by thermophilic microorganisms have attracted considerable attention, due to their excellent thermal resistance and biotechnological potential.

The aim of this work was to study the production and biochemical properties of the proteases from the thermophilic fungi *Humicola grisea var. thermoidea*, *Humicola insolens* and *Scytalidium thermophilum*. These molds have been tentatively joined by few mycologists in a group denominated Torula-Humicola Complex. These researchers postulated that *H. grisea var. thermoidea*, *H. insolens* and *S. thermophilum* were the same organism, which exhibited different morphological phenotypes when grown in different culture media. However, several experimental evidences from our laboratory showed that these molds exhibit significant morphological differences even after growth in the same physical conditions and in the same culture medium. Thus, a secondary goal of this work was to explore whether the proteases could be used as a rapid and easy tool to distinguish these three molds.

Independent of the strain used the highest production of extracellular protease activity occurred when 1.5 % glucose was offered as the main carbon source. The highest levels of extracellular proteases occurred after 48, 72 and 96 h growth for *H. grisea var. thermoidea*, *H. insolens* and *S. thermophilum*, respectively. Glucose, at concentrations above 1.5% drastically decreased protease production. Also, the yeast extract concentration showed to be an important factor for the

maximal extracellular protease production by the three microorganisms studied, with highest levels produced in the presence of 0.4% yeast extract.

For the three organisms studied, maximal proteolytic activity occurred when the level of glucose in the culture medium was drastically lowered. Interestingly, good levels of extracellular proteases were achieved when cellulosic materials were offered as main carbon sources, while casein was a poor carbon source for proteases production. These data suggested that the proteases were not induced for the hydrolysis of an exogenous protein offered simply as a carbon source. Perhaps the proteases produced in the presence of glucose or in culture media containing cellulose are related to cellular differentiation processes. However, it is clear that the enzymes are under catabolic repression, since in all strains the highest levels of proteases were found after a drastic reduction in glucose levels.

The optimum pH for the proteolytic activity was 8.0, 8.5 and 7.5 for *H. insolens*, *H. grisea var. thermoidea* and *S. thermophilum*, respectively. The proteases of the three molds exhibited maximal activities at 50°C. The enzymes from *S. thermophilum* and *H. insolens* were stable up to 50°C, with half-lives of 20 min and 11 min at 55°C, respectively. *Humicola grisea var. thermoidea* proteolytic activity was stable up to 55°C, and exhibited a half-life of 20 min at 60°C. At extreme pH (3 and 11), the proteases produced by the three strains showed good stability, even when incubated for 6 hours.

The enzymes from *H. insolens* and *S. thermophilum* were significantly activated by calcium, magnesium and β -mercaptoethanol. In contrast, these effectors did not influence the protease activity from *H. grisea var. thermoidea*. The presence of mixtures of calcium and magnesium in the reaction medium resulted in decreased enzymatic activities for *H. insolens* and *S. thermophilum* enzymes, compared to those estimated in the presence of each ion alone. These data suggested that calcium and magnesium compete by a single binding site.

Zymogram studies or analyses by detection of protease activity in gel slices after PAGE showed that each of the three strains produced three main extracellular proteases. The qualitative profiles of the activity bands/peaks were very similar for *H.*

grisea var. *thermoídea* and *H. insolens* crude extracts. However, there were differences in the relative amount of each protease between the two *Humicola* strains.

Comparatively, *S. thermophilum* produced a protease with a higher migration rate and presented only trace amounts of a protease corresponding to the major protease present in the crude extracts of both *Humicola* strains. These findings suggest that the zymograms of the extracellular protease-rich crude extract from the thermophilic strains *H. grisea* var. *thermoidea*, *H. insolens* and *S. thermophilum* may be very useful to distinguish the three molds using a simple procedure.

1. Introdução

1.1. Proteases

As proteases são enzimas degradativas que hidrolisam ligações peptídicas de proteínas para formar peptídeos e aminoácidos, são amplamente distribuídas na natureza e podem ser encontradas em bactérias, fungos filamentosos, leveduras, animais, vegetais entre outros (Rao *et al.*, 1998). Executam uma variedade de processos fisiológicos essenciais para o ciclo de vida dos organismos.

Os fungos, em particular, são excelentes fontes de peptidases (James, 2006). Nos fungos filamentosos as proteases são de extrema importância na obtenção de carbono, enxofre e nitrogênio. Estes microrganismos hidrolisam proteínas do meio ambiente e obtêm carbono e nitrogênio dos grupos carboxilas e amina, dos aminoácidos absorvidos. (Nelson & Cox, 2000).

Hanson & Marzluf (1975) mostraram que a expressão de proteases alcalinas em *Neurospora crassa* é regulada por genes e por sinais químicos eliciados por jejum de glicose, jejum de nitrogênio inorgânico e deficiência de enxofre. Na deficiência de uma dessas condições e com suplemento de proteína como fonte alternativa, ocorre a síntese e secreção da protease alcalina.

1.2. Classificação das proteases

Proteases não são facilmente classificadas devido à característica que possuem de grande diversidade de ação e estrutural (Rao *et al.*, 1998).

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (I. U. B) estas enzimas são classificadas como hidrolases nº 3 pertencentes ao subgrupo 4 (E. C. 3.4) (Said & Pietro, 2004). Porém a classificação proteásica é bem mais complexa do que isso, logo, são classificadas de acordo com 3 critérios: ligação peptídica a ser clivada (endopeptidases e exopeptidases), a natureza química do sítio catalítico (aspártico-proteases, cisteíno-proteases, metaloproteases e serino-proteases) e com relações evolucionárias em conformidade com a estrutura (de acordo com a seqüências de aminoácido, são subdivididas em “clãs” para

acomodar proteases que divergiram de um ancestral comum) (Rao *et al.*, 1998). As proteases podem também ser classificadas quanto ao pH ótimo de atuação em: ácidas, neutras e alcalinas (Said & Pietro, 2002).

Considerando a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica podem ser classificadas em: endopeptidases e exopeptidases (Rawlings & Barret, 1993). As endopeptidases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões amino e carboxi-terminal. Em contraste, as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região amino (aminopeptidases) ou carboxi-terminal (carboxipeptidases) (Rao *et al.*, 1998).

As enzimas proteolíticas são tradicionalmente agrupadas em cinco famílias: serino-proteases, treonino-proteases, cisteíno-proteases, aspártico-proteases e metaloproteases (Rawlings *et al.*, 2004). Dentro de cada família, há um número de subfamílias ou clãs que representam processos de convergência da evolução, exibindo diferentes dobras tridimensionais, mas conservando a disposição de resíduos no centro ativo (James, 2006).

De acordo com a faixa de pH na qual apresentam atividade ótima, podem ser classificadas como proteases ácidas, possuem maior atividade na faixa de pH de 2 á 6, neutras, atuam na extensão de pH de 6 á 8 e alcalinas, com atividade significativa na faixa de 8 á 13.

Considerando a constituição do sítio ativo destas enzimas podemos classificá-las como: aspártico-proteases (exclusivamente ácidas), cisteíno-proteases, metaloproteases (neutras) e serino-proteases (maioria alcalina, porém, podem existir algumas neutras) (Said & Pietro, 2002).

As aspártico-proteases são mais comumente conhecidas como proteases ácidas e tem um ácido aspártico essencial para a sua atividade catalítica (Rao *et al.*, 1998). São inibidas por pepstatina, e também possuem sensibilidade a compostos de diazoquetonio assim como diazoacetil-DL-norleucina metilester (DAN) e 1,2-epoxi-3-(p-nitrofenoxi) propano (EPNP) (Rao *et al.*, 1998).

Cisteíno-proteases exibem a cisteína como aminoácido essencial para expressão de atividade. Geralmente as cisteíno-proteases são ativas apenas na presença de agentes redutores assim como a cisteína, mercaptoetanol e outros reagentes que mantêm o grupo SH da protease no estado reduzido. São suscetíveis

a agentes sulfidril como p-cloromercurilbenzoato (PCMB), mas não são afetadas por di-isopropilfluorofosfato (DFP) e agentes quelantes de metais, como por exemplo, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Rao *et al.*, 1998).

As metaloproteases são caracterizadas pela exigência de um íon metálico bivalente para a obtenção de sua atividade máxima. A maioria delas possui zinco em seu sítio ativo, podem ter também cobalto e níquel, o qual se apresenta ligado a duas subunidades de histidina e uma de ácido glutâmico (Said & Pietro, 2004). A atividade dessas enzimas pode ser inibida sob ação de agentes quelante de metais como o EDTA.

As serino-proteases são caracterizadas por possuírem um grupo serina em seu centro ativo. São ativas na maioria das vezes em pH neutro e alcalino. Elas apresentam diferentes especificidades em relação aos resíduos de aminoácidos que fazem parte de ligação peptídica alvo (Said & Pietro, 2004). Um exemplo quanto à especificidade em relação aos resíduos de aminoácidos são as serino-proteases alcalinas: um subgrupo dessas proteases que hidrolisam ligações peptídicas formadas por tirosina, fenilalanina ou leucina posicionada ao lado da carboxila. Para o reconhecimento das serino-proteases são usados inibidores irreversíveis, como: fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF), 3,4-dicloroisocomarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans 2,3-epoxipropil-leucilamida (4-guanidina) butano (E. 64), DFP (RAO *et al.*, 1998).

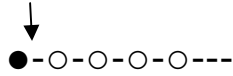
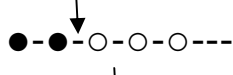
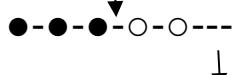

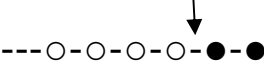

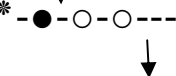
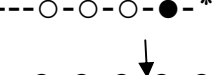

Protease	Modo de ação	EC nº
Exopeptidase		
Aminopeptidase		3.4.11
Dipeptil peptidase		3.4.14
Tripeptidil peptidase		3.4.14
Carboxipeptidase		3.4.16 - 3.4.18
Serino-protease		3.4.16
Metaloprotease		3.4.17
Cisteíno-protease		3.4.18
Peptidil dipeptidase		3.4.15
Dipeptidases		3.4.13
Omega peptidases		3.4.19
		3.4.19
Endopeptidase		3.4.21 – 3.4.34
Serino-protease		3.4.21
Cisteíno-protease		3.4.22
Aspártico-protease		3.4.23
Metaloprotease		3.4.24
Endopeptidases de desconhecido mecanismo		3.4.99
Catalítico		

Figura 01: Classificação das proteases. (○) representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica. (●) indicam os aminoácidos terminais e o bloqueio terminal. (↓) mostram os sítios de ação das enzimas (Rao *et al.*, 1998).

1.3. Importância Fisiológica das proteases nos seres vivos

As proteases são conhecidas por exercerem inúmeras funções reguladoras nos diferentes organismos da escala evolutiva. Exemplo fácil e clássico de ser citado é o caso do tripsinogênio, o qual é sintetizado no pâncreas de mamíferos e se transforma em tripsina no intestino delgado após a ação de uma protease.

Em microrganismos, as proteases participam em vários processos de diferenciação celular e são estudadas há muitos anos.

O “turnover” de proteínas, degradação e substituição da proteína é uma função proteásica comprovada por experimentos com mutantes deficientes para esta enzima, logo com falta de bom “turnover” (Rao *et al.*, 1998). As proteases em sementes estão envolvidas com a germinação. Esporos dormentes carecem de aminoácidos que são essenciais para o processo de germinação. A degradação de proteínas em esporos dormentes por proteases disponibiliza os aminoácidos e nitrogênio para biossíntese de novas proteínas, para que dessa forma a semente germine (Rao *et al.*, 1998).

Em microrganismos as proteases extracelulares, em sua maioria, catalisam a hidrólise de grandes proteínas a pequenas moléculas para absorção, em contraste as proteases intracelulares desempenham um papel crítico na regulação do metabolismo celular. Entretanto, os fenômenos da regulação da produção de proteases ainda são fragmentários.

O sistema regulatório da síntese de proteases é conhecido em detalhes em fungos filamentosos como a *N. crassa* e o *Aspergillus nidulans* (Hanson & Marzluf, 1975). Nestes organismos, as proteases mais conhecidas são aquelas relacionadas à obtenção de carbono, enxofre e nitrogênio, quando fontes de mais fácil assimilação como glicose, sacarose, sais de enxofre ou nitrogênio estão ausentes no meio de cultura (Hanson & Marzluf, 1975; Savtchenko *et al.*, 1986).

Em *Aspergillus*, a simples deficiência de carbono, nitrogênio ou enxofre já é suficiente para induzir a síntese de protease (Cohen, 1973). Já em *Neurospora*, em qualquer destas situações de deficiência há necessidade de proteínas como fonte de carbono alternativa (Hanson & Marzluf, 1975).

Durante os últimos anos, dada a maior ênfase na proteção ao meio ambiente, os usuários de enzimas elegeram os organismos termófilos e extremófilos (Mehta *et al.*, 2006) como importantes fontes de enzimas para substituição da catálise química. Entretanto, pouco se sabe sobre as propriedades das proteases dos termófilos e nada é conhecido sobre os processos de indução da síntese dessas enzimas nesses microrganismos. Pesquisas literárias revelaram que existem apenas dois trabalhos sobre proteases de fungos verdadeiramente termófilos. Um deles trata de uma protease ácida isolada de *Penicillium duponti* (Hashimoto *et al.*, 1973), enquanto o outro trata de uma protease alcalina de *Scytalidium thermophilum*, crescido em meio contendo celulose como principal fonte de carbono (Ifrij & Ögel, 2002).

1.4. Características das proteases produzidas por microrganismo

Proteases microbianas estão entre as mais importantes enzimas hidrolíticas e tem sido extensivamente estudadas desde o advento da enzimologia (Gupta *et al.*, 2002). Tal interesse é baseado na busca de enzimas termoestáveis que conferem vantagens no processo industrial (Zanoelo *et al.*, 2004).

Diferentemente das enzimas de origem vegetais e animais, as de origem microbiana não dependem das intempéries climáticas, uma vez que são produzidas em fermentadores onde as condições de cultivo são finamente controladas. Adicionalmente microrganismos possuem facilidade de crescimento e não exigem amplos espaços para cultivo. Além disso, existe uma enorme biodiversidade de microrganismos disponíveis nos mais variados habitats da natureza (Said & Pietro, 2004).

Fungos filamentosos são bons produtores de proteases extracelulares. Jonsson & Martin (1965), estudaram muitas culturas de fungos para a produção de proteases e relataram que a quantidade de proteases produzidas varia muito com a linhagem e meio utilizado (Anwar & Saleemuddin, 1998).

Na Tabela 1 podemos observar algumas características de proteases estudadas de diferentes microrganismos. A temperatura ótima para as proteases pode variar bastante dependendo do organismo que a produziu assim como o pH.

As alcalino proteases são um grupo de enzimas fisiologicamente e comercialmente importantes, usadas inicialmente como aditivos em detergentes (Kumar & Takagi, 1999). Atualmente esta aplicação persiste, porém a aplicação industrial de proteases é mais abrangente se estendendo a indústria de alimentos, processamento do couro, hidrolisados protéico, ultimamente tem aumentado consideravelmente o uso de proteases alcalinas como biocatalisadores.

Microrganismos extremofílicos são bons produtores de proteases e podem ser aplicados a indústria porque em sua maioria originam enzimas com ótima termoestabilidade e ótima estabilidade ao pH mas isso é contraposto pelas dificuldades de cultivo de microrganismos extremofílicos em cultura de laboratório (Gomes & Steiner, 2004) Ainda que tentativas tenham sido feitas para solucionar tais problemas, não existe ainda uma solução satisfatória para a maioria deles (Said & Pietro, 2004).

Dessa forma, a utilização de microrganismos com exigências menos extremas para o crescimento em laboratório, como é o caso dos fungos termófilos, é mais atrativa e pode ter sucesso imediato em indústrias com menor poder econômico. A utilização das proteases em processos industriais e a caracterização acadêmica destas hidrolases são procedimentos antigos.

Tabela 01: Características das proteases produzidas por microrganismos.

Microorganismo	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Aplicação biotecnológica/biológica	Referências
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	8	Bioconversão de resíduos	Wang <i>et al.</i> , 2005.
<i>Aspergillus oryzae</i> MTCC5341	55	3-4	Modificação de proteínas alimentares e auxiliar digestivo	Vishwanatha <i>et al.</i> , 2009.
<i>Bacillus sp. Protease L 21</i>	60	11	Aditivo em detergentes	Genckal & Tari, 2006.
<i>Bacillus circulans</i>	70	11	Couro e detergente	Rao <i>et al.</i> , 2009.
<i>Bacillus subtilis Protease MRT</i>	50	7,5	Propriedades nematocidas	Gerald <i>et al.</i> , 1990
<i>Bacillus subtilis</i> 38	47	6,5	Industria alimentícia	Chantawannakul <i>et al.</i> , 2002.
<i>Clonostachys rosea</i>	60	9-10	Processo de infecção	Li <i>et al.</i> , 2006
<i>Dactylella shizishanna</i>	55	10	Propriedades nematocidas	Wang <i>et al.</i> , 2006.
<i>Penicillium sp.</i>	45	6,5	Aditivo em detergentes	Germano <i>et al.</i> , 2003.
<i>Prevotela ruminicola</i> 23	40	6,8	Aditivo em detergentes	Wang & Hsu, 2005.

1.5. Aplicação das proteases

Proteases acometem grande parte da indústria de enzimas comercializadas devido à rica aplicação biotecnológica e a vasta extensão de processos industriais que são encontradas (Anwar & Saleemuddin, 1998). Contabilizam 60% do total da indústria do comércio de enzimas (Merheb *et al.*, 2006).

As proteases são aplicadas a indústria de detergentes (Venugopal & Saramma, 2006), amolecimento da carne (Genckal & Tari, 2006), clarificação da cerveja, indústria do leite, hidrolisados de proteínas, síntese de peptídeos, separação de aminoácidos de misturas racêmicas, conversão de resíduos naturais em biomassa usual (chifre, pena, pêlos) (Anwar & Saleemuddin, 1998), na produção de gelatinas com diferentes graus de endurecimento, na fabricação de inseticidas contra nemátodos (Wang *et al.*, 2006) , na fabricação de rações para a agropecuária (Wang & Hsu, 2005) e ainda na substituição da catálise química em processos industriais (Mehta *et al.*, 2006).

Atualmente, devido ao grande número de aplicações das proteases na indústria houve um aumento da procura por proteases com alta atividade catalítica, com atuação em pHs alcalinos, alto grau de especificidade, tolerantes a temperaturas altas e que possam ser produzidas em grande quantidade, porém em condições economicamente viáveis (Anwar & Saleemuddin, 1998).

As proteases são enzimas com grande futuro biotecnológico, tendo em vista a tendência para o desenvolvimento de tecnologias protetoras do meio ambiente juntamente com o grande potencial econômico e extensivas aplicações (RAO *et al.*, 1998).

Na última década houve um acentuado interesse em proteases alcalinas, visando o tratamento do couro. As proteases seriam usadas alternativamente no passo de depilação ao invés de agentes químicos, com o objetivo de diminuir a utilização de substâncias corrosivas, tóxicas e poluidoras ao meio ambiente (RAO *et al.*, 1998).

O uso de proteases através do extrato bruto enzimático é de grande vantagem econômica para as indústrias, devido à facilidade e baixo custo de obtenção atualmente indústrias de detergente e de alimentos já utilizam o extrato (RAO *et al.*, 1998).

1.6. Termofilia

Os microrganismos podem ser classificados quanto a sua temperatura de crescimento em psicrófilos, mesófilos e termófilos. Os fungos psicrófilos crescem em uma temperatura ótima ao redor de 15°C e não crescem a cima de 20°C, já os mesófilos exibem um crescimento expressivo a 37°C e não crescem a cima de 40°C, porém exibem um considerável crescimento entre 20-22°C. Os fungos termófilos exibem máxima velocidade de crescimento ao redor de 45 °C e não crescem abaixo de 23 °C (Cooney & Emerson, 1964). A termofilia em fungos não é extrema como em eubactérias e arqueobactérias, algumas espécies são capazes de crescer a 100°C. Entretanto, considerando que a vasta maioria dos eucariotos não pode sobreviver a prolongadas exposições de temperatura próximas de 40°C para 45°C a capacidade de aproximadamente 30 espécies de 50.000 em violar altas temperaturas limitantes para eucariotos é um fenômeno que merece valorização e mais estudos (Maheshwari *et al.*, 2000).

Os fungos termofílicos constituem o principal componente da microflora que se desenvolve em amontoados de matéria de plantas, pilhas de armazenamento de agrícola, produtos de floresta, e outros materiais orgânicos acumulados onde o calor e a umidade, além do ambiente aeróbico, fornecem condições básicas para seu desenvolvimento (Maheshwari *et al.*, 2000).

Esses microrganismos possuem como características alta resistência a variações de temperatura e rápido “turnover” de proteínas

O primeiro fungo considerado verdadeiramente termófilo, *Mucor pusillus*, foi isolado do pão há um século e descrito em 1886 por Lindt (Cooney & Emerson, 1964). Mais tarde Tsiklinskaya (Maheshwari *et al.*, 2000) descobriu outro fungo termofílico *Thermomyces lanuginosus*, crescendo sobre batata. Porém as condições

que favoreciam o crescimento destes fungos ficaram desconhecidas até Hugo Miehe investigar o auto-aquecimento e combustão de produtos agrícolas ensacados e armazenados (Maheshwari *et al.*, 2000). O mistério da termogênese foi desvendado através de estudos da microflora ali presente e do conhecimento dos fungos termófilos pertencentes a ela, além das condições que favoreciam seu crescimento (Maheshwari *et al.*, 2000).

Os fungos termófilos representam uma pequena parcela da comunidade fúngica, exibindo resistência ao calor como propriedade fisiológica distintiva (Cooney & Emerson, 1964). Para a enzimologia industrial a resistência ao calor é uma característica altamente desejável, preservando as enzimas contra inativação térmica e facilitando o manuseio e o transporte.

Alguns fungos filamentosos e as enzimas que eles produzem têm sido utilizados em indústrias de processamento de alimentos por muitas décadas. O potencial industrial dos fungos filamentosos tem estimulado pesquisas para o desenvolvimento de processos de fermentação em larga escala, purificação de enzimas e métodos de melhoramento de linhagens, resultando em uma melhor contribuição da utilização de fungos na indústria (Said & Pietro, 2004).

1.7. Complexo *Tórula-Humicola*

O complexo *Torula - Humicola*, conforme proposto por Straatsma & Samson (1993) compreende os fungos filamentosos dos gêneros: *Humicola*, *Torula* e *Scythidium*. Os fungos que integram este complexo são usados principalmente para adubar o cultivo de *Agaricus bisporus* garantindo uma boa produção e colheita. *Humicola grisea var. thermoidea*, *Scythidium thermophilum*, *Humicola insolens* e *Torula thermophilum* foram muito estudados e discutidos por vários pesquisadores a fim de obterem uma taxonomia e nomenclatura sólida. Em 1993 Straatsma & Samson com o objetivo de clarear a taxonomia e nomenclatura destes organismos, isolaram mais de trinta espécies de fungos do Complexo *Torula-Humicola* e os examinaram quanto a sua morfologia macroscópica, microscópica e o potencial de indução da produção de micélios de *A. bisporus*, conhecido popularmente como

champignon. Nestes estudos Straatsma & Samson (1993) observaram as variações morfológicas existentes quanto o crescimento rápido ou vagaroso, a coloração após sucessivos subcultivos (macroscópico), formato e coloração dos conídios, hifas aéreas hialínicas (microscópico). E propuseram que todas as três linhagens seriam uma única espécie variável, ou um morfológico e indistinguível complexo de espécies que apresentariam ligeiras diferenças morfológicas observáveis a olho nu, devido às diversas condições de cultivos empregadas nos diversos laboratórios e consideraram que *S. thermophilum* seria o correto nome para os fungos *T. thermoplia*, *H. grisea* var. *thermoidea* e *H. insolens*. Mesmo observando a ampla e integral variação morfológica de *T. thermophila*, *H. grisea* var. *thermoidea* e *H. insolens*, além das características macroscópicas e microscópicas não serem correlacionadas entre estes isolados e embora muitos dos isolados possam ser separados sob a base de uma única característica de conídios, Straatsma & Samson acreditam que estas características são insuficientes para separar os isolados em nível de gêneros ou de espécie.

Cooney & Emerson (1964) comentam em seu livro "Thermophilic Fungi an account of their biology, activities, and classification" que Fergus C. L. sugeriu que o microrganismo descrito por eles *H. grisea* var. *thermoidea* poderia ser melhor agrupado como uma variedade de *Humicola nigrescens*. Fergus baseou essa sugestão pelo fato da presença de fialosporos em *Humicola grisea* e carência de fialosporos em ambos *H. nigrescens* e *H. grisea* var. *thermoidea*. Mas Cooney & Emerson (1964) localizaram seu isolado como uma variedade de *H. grisea* devido à incomum ocorrência de clamidósporos intercalares em ambas as espécies e na sua variedade *thermoidea*.

Análises microscópicas mostram diferenças acentuadas nas formas dos conidióforos e *H. insolens*, *H. grisea* var. *thermoidea*, *T. thermophila* e *S. thermophilum* (Cooney & Emerson, 1964). Além disso, análise dos quatro fungos em nosso laboratório, sob as mesmas condições de cultivo, mostra diferenças marcantes na morfologia, velocidade de crescimento e expressão de enzimas (Kadowaki *et al.*, 1996; Cardello *et al.*, 1994).

1.8. Organismos de estudo

Os fungos termófilos vivem em solos, preferencialmente em substratos ricos em celulose, como a decompostagem. Os exemplos mais característicos de fungos termófilos são *Chaetomium thermophilum*, *H. grisea* var. *thermoídea*, *H. insolens* e *S. thermophilum*. Os gêneros *Humicola* e *Scytalidium* são mitospóricos. (Cooney & Emerson, 1964). Estes fungos produzem conídios que podem conter de 3 a 30 núcleos (Rodrigues *et al.*, 1991). Em nosso laboratório foi detectado que conídios com muitos núcleos são mais pigmentados, produzem enzimas mais termo-resistentes e são mais celulolíticos.

1.8.1. *Humicola grisea* var. *thermoídea*

É um fungo termofílico primeiramente isolado em 1948 de esterco de elefante no Zoológico de Fleishhacker em São Francisco, Califórnia. Este fungo se parece com a espécie *H. grisea* mesofílica, mas seus hábitos de crescimento são claramente diferentes dos hábitos da espécie mesofílica. O gênero *Humicola* pertence à classe dos Deuteromicetos, a ordem Moniliales, e a família Dermatiaceae. Quando incubado em temperatura de 35-50°C em YpSs o fungo cresce muito rápido, em 36 h as colônias já recobrem a superfície de ágar de uma placa de petri de 6 cm. As poucas hifas coloridas são muito finas, quando incubado em temperatura de 35-50°C raramente excedem 3,5 µ em largura, no estágio inicial de crescimento a coloração do micélio é branca. Em dois dias os aleuriosporos maduros acinzentam a colônia por inteiro e a coloração visível é um cinza escuro, que se tornam cinza opaco no terceiro dia de cultivo. Esporulação típica tem início pela formação de protuberâncias laterais em um ângulo reto da hifa. Os aleuriosporos maduros são marrom escuros, parede uniforme, geralmente globosos e com 8-6 µ em diâmetro. Mas eles podem ser ovais e em alguns casos chegam a medir 12-16 x 8-12 µ. Fialosporos não foram observados nestes organismos (Cooney & Emerson, 1964).

1.8.2. *Humicola insolens*

É um fungo termofílico pertencente à classe dos Deuteromicetos, a ordem Moniliales, e a família Dermatiaceae foi originalmente isolado por Allen (Cooney & Emerson, 1964) em 1944 através da maceração de um arbusto do sudeste dos Estados Unidos e México denominado popularmente como “guayule”. Este arbusto cientificamente é conhecido como *Parthenium argentatum* e sua seiva foi considerada como uma fonte potencial de borracha natural durante a Segunda Guerra Mundial (Cooney & Emerson, 1964). Evidências de esporulação podem ser vistas após 48 h de cultivo a 40 °C em meio YpSs. A primeira indicação de produção de esporos consiste em protuberâncias dispersas ou grupos de protuberâncias ao longo da hifa. Nas primeiras 24 h de crescimento a coloração observada é um amarelo-amarronzado.

A coloração da colônia depende da idade do esporo. Culturas jovens são brancas, mas quando os esporos estão completamente maduros a cultura toda se torna marrom (Cooney & Emerson, 1964).

Três métodos de esporulação parecem existir neste organismo: o mais comum é o de produção de esporos intercalados, que podem ser produzidos sozinhos ou em pares e ocasionalmente em curtas mudas. Aleuriosporos sozinhos são sustentados terminalmente sobre a hifa ou sobre uma curta parte do ramo. Esporos imaturos são menos coloridos ou amarelados e se tornam marrons quando chegam à maturidade. Os aleuriosporos são em geral globosos ou subglobosos com 7,7-12,5 μ de diâmetro. Entretanto é comum aleuriosporos com formato de frascos de 14-20 x 8-10 μ de tamanho, ocasionalmente podem ocorrer esporos grandes, esporos em forma circular de 14-20 x 8-15 μ . Fiálides não foram observadas neste microorganismo (Cooney & Emerson, 1964).

1.8.3. *Scytalidium thermophilum*

É um fungo termofílico originalmente isolado a partir de matéria orgânica em decomposição do solo da Índia (Zanoelo *et al.*, 2004). Este fungo é classificado como um Deuteromiceto da ordem Moniliales, e da família Dermatiaceae, cresce rapidamente e pode atingir um diâmetro de 9 cm em 5 dias a 40°C. Primeiramente sua coloração é clara, mas logo se torna verde-acinzentado e pode chegar a preto. Possuem hifas hialínicas vegetativas aéreas com amplitude de 4-6 µm, e parede uniforme. Seus conídios são globosos elipsoidais de 8-12 µm de amplitude, com parede uniforme grossa e o principal pigmento é escuro, podem nascer sozinhos, em curtas cadeias de curtos ramos laterais, ou em cadeias intercalares (Straatsma & Samson, 1993)

2. Objetivo

O objetivo primordial deste trabalho foi estudar comparativamente as proteases dos fungos termófilos *Humicola grisea* var. *thermoídea*, *Humicola insolens* e *Scytalidium thermophilum*. Foi dada especial atenção ao efeito da fonte de carbono na produção, caracterização das propriedades bioquímicas das proteases e estudos dos zimogramas para distinção rápida dos três fungos.

2.1. Etapas Específicas

- 1) Estudo das melhores fontes indutoras para produção enzimática assim como das fontes repressoras.
- 2) Cinética da produção da enzima.
- 3) Caracterização bioquímica: a) temperatura ótima aparente, b) pH ótimo aparente, c) termoinativação d) estabilidade a uma ampla faixa de pH e e) efeito de íons sobre atividade enzimática.
- 4) Detecção das proteases após PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida) e reconhecimento das diferentes enzimas proteolíticas para comparação entre as linhagens (zimograma).

3. Material e Métodos

3.1. Linhagens utilizadas

Para a realização deste trabalho foram utilizados os fungos *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum*.

H. insolens foi isolado das fezes da *Lhama glama* do Bosque Municipal de Ribeirão Preto – S.P (1983) e identificado pela morfologia do conidióforo como sugerido por Cooney e Emerson (1964).

H. grisea var. thermoídea isolado pelo Professor Dayson da Silva na Universidade Federal de Viçosa - M.G.

S. thermophilum, foi isolado do solo da Índia e gentilmente cedido pelo Dr. G. Straastma da “Mushroom Experimental Station” (Holanda).

3.2. Condições de crescimento

3.2.1 Manutenção da linhagem em meio sólido

As linhagens foram mantidas em laboratório em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio sólido composto por 4% de farinha de aveia (Quaker) e 2% de ágar. As culturas em ágar-inclinado foram desenvolvidas a 40°C por até 10 dias e, posteriormente conservadas em geladeira, sendo usadas até um período de 30 dias de estocagem.

3.2.2. Meio líquido

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyers com capacidade cinco vezes maior que o volume do meio e eram compostos de:

Ca Cl ₂	0,1%
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	0,05%
Extrato de Levedura.....	0,4%
*Fonte de Carbonono.....	1%

*A fonte de carbono foi padronizada neste estudo, após resultados iniciais todos os experimentos foram feitos com glicose nas concentrações de 1%, 0,75% e 1,5% para *H. insolens*, *H. grisea var. thermoidea* e *S. thermophilum*, respectivamente. Os meios foram preparados com água destilada e autoclavados a 127°C e 1,5 atm por 30 min.

3.3. Obtenção dos conídios

Os conídios foram obtidos a partir de culturas estoques mantidos no laboratório como descritos no item 3.2.1. Os conídios foram suspensos acrescentando 10 ml de água destilada estéril em cada tubo estoque e raspando-se a superfície da cultura com um bastão de vidro. Um ml desta suspensão foi utilizado para o inóculo em meio líquido.

3.4. Crescimento em meio líquido

As culturas foram desenvolvidas em incubadora regulada para 40°C e com agitação constante de 100rpm. Os tempos de cultivo foram variados e serão descritos nos itens pertinentes.

3.5. Obtenção da massa micelial e do meio de cultura

A massa micelial de cada fungo foi crescida nas condições descritas anteriormente e separada do meio de cultivo por filtração a vácuo utilizando funil de Buchner e papel de filtro Whatman nº1. As massas obtidas foram lavadas com 2 volumes de água destilada e prensadas entre folhas de papel de filtro para retirar o máximo possível de água embebida. Após isso, os micélios foram mantidos em baixa temperatura (-12°C) para posterior utilização. Depois de congelados, os micélios foram macerados com dois volumes de areia lavada em ácido, em um cadinho de porcelana até ruptura total das células. Os macerados foram ressuspensos em 5 ml de água destilada. A areia e os restos celulares foram removidos por centrifugação a 10.000 rpm a 4°C por 15 min. O sobrenadante dessa centrifugação de cada amostra foi denominado extrato bruto e usado como fonte de enzima intracelular.

Os meios de cultura que contém a enzima extracelular solúvel foram também conservados em temperaturas baixas até sua utilização.

3.6. Determinação das atividades enzimáticas

3.6.1. Preparo do substrato

O substrato empregado foi a azocaseína (Sulfanilamide-Azocasein) – Sigma (102110-74-7), dissolvida em tampão Caps 100 mM pH 9,5 em uma concentração de 0,8%.

3.6.2 Protease

A atividade da protease foi detectada pela formação de azopeptídios que conferiram a coloração amarelada a reação a partir da hidrólise da azocaseína Sigma (102110-74-7) utilizada como substrato.

A reação foi conduzida a 45°C e constituída de 1 ml do substrato (conforme descrito no item anterior) e 1 ml de enzima convenientemente diluída. Nos tempos desejados alíquotas de 0,5 ml foram retiradas e a reação foi bloqueada com 0,5 ml de T.C.A. 20% (ácido tricloroacético). Em seguida, a mistura foi mantida no gelo por 1h e o precipitado formado foi retirado através de centrifugação por 10 min em centrífuga Eppendorf (14000xg), como recomendado por Wang & Hsu (2005). Foram retirados 0,5 ml de sobrenadante de cada amostra centrifugada e a ele acrescidos 2 ml de NaOH 1M. Os azopeptídios liberados foram determinados através da medida da absorbância a 450nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µg de substrato por hora (Brock *et al.*, 1982). A atividade específica foi definida através da relação entre o número de unidades por miligrama de proteína.

3.7. Quantificação de açúcares em meio de cultura

O teor de açúcares foi quantificado pelo método de Miller (1959). Para quantificar o açúcar existente nas amostras de meio de cultura estas foram diluídas convenientemente com água a fim de completar 1 ml. Posteriormente, adicionamos 1 ml de DNS a reação, fervemos por 5 min, esfriamos e diluímos com 10 ml de água. Em seguida, a absorbância da amostra foi medida em colorímetro a 540 nm. A curva padrão foi construída usando glicose e variando-se a concentração de 0 a 1 mg/ml.

3.8. Determinação quantitativa de proteínas

A quantificação de proteínas foi estimada pelo método de Lowry *et al.*, (1951) para amostras com grandes quantidades de proteínas ou Bradford (1976) para amostra com poucas proteínas. Soro albumina bovino (BSA) foi utilizado como padrão.

3.9. Determinação das propriedades bioquímicas das proteases

3.9.1. Determinação da temperatura e pH ótimos

Para a determinação das temperaturas ótimas e pHs de ensaio as amostras previamente crescidas em meio já padronizado foram ensaiadas conforme item 3.6.2 em temperaturas variadas 35-70°C. O pH ótimo de reação foi posteriormente constatado utilizando os tampões Mc Ilvaine pH (5.0 a 8.0) Tris-base pH (7.0 a 9.5) e Caps pH (9.5 a 11). Todos os tampões estavam na concentração de 100 mM.

3.9.2. Determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH

Para determinação da termoestabilidade e estabilidade ao pH o filtrado bruto foi obtido conforme item 3.5 e em seguida dialisado. As amostras foram expostas a diferentes temperaturas que variaram de 35 a 70°C. Alíquotas nos tempos desejados foram retiradas e então as atividades remanescentes foram medidas conforme proposto para proteases.

Na determinação da estabilidade ao pH foram utilizados os tampões Mc Ilvaine pH(3.0 a 8.0) , Tris-base pH (7.0 a 9.5), Caps pH (9.5 a 11.0) e Ácido Bórico pH (11.0 a 13.0). Os quatro tampões estavam na concentração de 100 mM. As amostras anteriormente dialisadas foram incubadas em gelo com seus tampões por 1 h e após este tempo, alíquotas foram retiradas e ensaiadas como já descrito. É importante salientar que o tampão utilizado para este

teste de atividade estava na concentração de 200 mM para garantir o tamponamento da reação.

3.9.3. Tempo de estabilidade a pHs extremos

Devido a ampla faixa de estabilidade ao pH, realizamos experimentos para determinação do tempo de estabilidade aos pHs extremos. Para isso os tampões utilizados foram Mc Ilvaine pH 3.0 e Ácido Bórico pH 11.0.

Amostras dos extratos brutos dialisadas foram submetidas aos pHs citados acima por um período de até 6 h e posteriormente ensaiadas como descrito em itens anteriores.

3.10. Influência de diferentes compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol sobre a atividade das proteases extracelulares.

As proteases dialisadas foram ensaiadas na presença, na ausência e com a mistura de diferentes compostos iônicos, EDTA e β -mercaptoetanol. Foram utilizadas concentrações de 1 e 10 mM para cada íon, EDTA e β -mercaptoetanol. As misturas foram constituídas de dois ou mais componentes, porém cada efector estava na concentração de 1mM, nos testes de atividade proteásica. Os ensaios foram realizados com o tampão no pH adequado para cada enzima com azocaseína como substrato.

3.11. Determinação das diferentes proteases produzidas pelos microrganismos

3.11.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturante (PAGE)

As eletroforeses não-desnaturantes foram realizadas em géis de poliacrilamida conforme metodologia de Davis (1964), para proteínas ácidas.

O gel numa concentração de 7% de acrilamida foi polimerizado em tubos (0,5 cm X 7 cm). As amostras a serem analisadas eletroforéticamente foram diluídas em tampão de amostra (tampão de corrida 1: 10).

As eletroforeses foram realizadas em tampão de corrida pH 8.9 (constituído de Tris-HCl 50 mM e glicina 36 mM), durante 1-2 h a temperatura ambiente sob corrente 4 mA/tubo. Após a corrida, os géis em tubo foram retirados dos mesmos e lavados por três vezes a cada 20 min com o tampão utilizado para a reação de atividade próprio para cada enzima. Posteriormente os géis foram cortados em fatias de 0,25 cm em 0,25 cm. Os pedaços foram incubados com 1 ml de substrato em tampão adequado. A reação foi deixada a 50°C por 20 h.

3.12. Tratamento dos dados

Os resultados apresentados para padronização dos meios de cultivos, determinação das condições ótimas das enzimas referem-se à média de pelo menos três experimentos diferentes.

4. Resultados

4.1. Padronização do Meio de Cultivo

4.1.1. Variabilidade da Composição do Meio de Cultivo: Fontes de Carbono

Para a etapa inicial do desenvolvimento deste trabalho, foram otimizadas algumas condições de cultivo para *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* a fim de estabelecer o melhor meio de cultivo para obtenção da produção das proteases destes fungos. O meio de cultivo escolhido inicialmente para realização dos experimentos continha: CaCl_2 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; extrato de levedura 0,4% e fonte de carbono adequada 1%. As fontes de carbono utilizadas foram: glicose, farinha de centeio, amido, farelo de trigo, lactose, farelo de soja, bagaço de cana, palha de arroz, sacarose, caseína, gelatina e leite desnatado. As culturas foram incubadas a 40°C durante 72 h, sob agitação constante de 100 rpm. Os resultados obtidos neste experimento estão resumidos nas Tabelas 2, 3 e 4. A melhor produção de protease foi obtida quando o meio foi suplementado com 1% de glicose como fonte de carbono (Tabela 2, 3 e 4) para as enzimas extracelulares de *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum*, respectivamente. Para a melhor produção das proteases intracelulares (Tabela 2, 3 e 4) as melhores fontes de carbono foram glicose e farinha de centeio, porém amido e farelo de trigo também foram fontes que possibilitaram boa produção proteásica para *H. insolens*. Para o *H. grisea var. thermoídea* as melhores fontes foram glicose e farelo de soja (Tabela 3), mas é importante destacar que amido e farinha de centeio também proporcionaram uma boa produção da enzima intracelular. Entretanto, o nível de protease intracelular em meio contendo farinha de centeio foi duas vezes menor em relação ao meio suplementado com glicose. Já para *S. thermophilum* verificamos que a melhor fonte de carbono para a produção proteásica intracelular foi amido seguido de farelo de soja e glicose.

Ao compararmos a atividade proteásica extracelular (U/ml) do meio suplementado com glicose e o suplementado com caseína, a qual é considerada um dos melhores indutores de proteases, verificamos o aumento da produção em 18 vezes a favor do meio com glicose para *H. insolens*. Já para *H. grisea var. thermoídea* este aumento na produção

foi de 22 vezes e para *S. thermophilum* constatamos que o aumento foi de aproximadamente 15 vezes ambos a favor do meio suplantado com glicose. Ao observarmos a atividade específica das mesmas fontes para *H. insolens* este aumento foi de 111 vezes em favor do meio contendo glicose, para *H. grisea var. thermoidea* foi 233 vezes e para *S. thermophilum* foi de aproximadamente 60 vezes a favor do meio suplementado com glicose. Outra importante verificação feita quanto às fontes de carbono foi à produção de proteases através do bagaço de cana, um resíduo agro-industrial de obtenção barata e encontrado em abundância na região. Esse resíduo economicamente barato tornaria ainda mais viável à produção de proteases para processos industriais. Comparando a atividade proteásica (U/ml) extracelular entre o meio suplementado com caseína e o com bagaço de cana para *H. insolens* e *S. thermophilum* constatamos um aumento de cerca de 4 vezes a favor do meio contendo bagaço de cana. Para o *H. grisea var. thermoidea* esse aumento foi de aproximadamente 8 vezes a favor do meio suplementado com bagaço de cana. Ao verificarmos a atividade específica este aumento na produção foi cerca de 10 vezes para *H. insolens*, de 36 vezes para *H. grisea var. thermoidea* e 11 vezes para *S. thermophilum* a favor do meio suplementado com bagaço de cana.

A farinha de centeio também foi uma fonte de carbono que possibilitou uma boa produção de protease extracelular para *H. insolens* (Tabela 2). A produção da enzima extracelular para esta fonte de carbono foi de 479,93 U/ml. Entretanto, comparando os meios suplementados com glicose e com farinha de centeio, há um aumento de aproximadamente 2 vezes da atividade específica a favor da primeira fonte.

Para o *H. grisea var. thermoidea* verificamos que amido pode também ser usado como uma fonte produtora de protease. A produção da protease extracelular para o meio suplementado com amido foi de 435,78 U/ml. Comparando os meios contendo a glicose com o contendo

o amido, notamos que há uma semelhança grande da atividade específica de ambos.

Para o *S. thermophilum* constatamos que palha de arroz foi também uma boa fonte para produção de protease. O fungo exibiu uma produção da enzima extracelular de 832,94 U/ml quando submetido em meio suplementado com palha de arroz. Porém ao comparar as atividades específicas extracelulares dos meios suplementados com glicose e palha de arroz, observamos um aumento de aproximadamente 3 vezes a favor do meio suplementado com glicose.

Tabela 02: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de *Humicola insolens*.

Fonte de Carbono 1%	U/ml	mg/ml	U/mg	U/ml	mg/ml	U/mg
	(Extra)	(Extra)	(Extra)	(Intra)	(Intra)	(Intra)
Glicose	558,14	0,52	1073,34	243,51	2,64	92,23
Farinha de Centeio	479,93	0,72	666,56	69,32	1,37	50,59
Amido	232,12	0,25	928,48	53,65	1,79	29,97
Farelo de trigo	164,24	0,66	248,84	NP	NP	NP
Lactose	158,08	0,52	304	43,11	1,73	24,91
Farelo de soja	115,52	0,86	134,33	24,08	5,07	4,74
Bagaço de cana	105,06	1,07	98,18	NP	NP	NP
Palha de arroz	61,59	1,01	60,98	NP	NP	NP
Sacarose	50,09	0,35	143,11	12,87	0,44	29,25
Caseína	31,69	3,28	9,64	13,14	5,09	2,58
Gelatina	23,13	3,03	7,63	8,21	3,45	2,38
Leite desnatado	10,94	1,19	9,19	NP	NP	NP

*As linhagens foram cultivadas em 25 ml de meio líquido acrescido de 1% das fontes de carbono, por um período de 72 h a 40°C, sob agitação constante de 100 rpm. A reação foi determinada pelo teste de atividade recomendado por Wang & Hsu (2005). NP= não foi possível testar atividade, pois o micélio cresce grudado na fonte de carbono, impedindo a correta determinação da atividade específica.

Tabela 03: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de *Humicola grisea var. thermoidea*.

Fonte de Carbono 1%	U/ml (Extra)	mg/ml (Extra)	U/mg (Extra)	U/ml (Intra)	mg/ml (Intra)	U/mg (Intra)
Glicose	544,05	0,40	1360,13	143,71	2,48	58
Amido	435,78	0,33	1320,54	51,54	1,27	41
Farinha de centeio	279,06	0,43	648,97	39,10	1,22	32
Farelo de soja	199,83	0,88	227,07	106,07	2,08	51
Bagaço de cana	188,48	0,90	209,42	NP	NP	NP
Farelo de trigo	108,81	0,53	205,30	NP	NP	NP
Leite desnatado	102,92	0,86	119,67	NP	NP	NP
Palha de arroz	79,13	0,77	103,81	NP	NP	NP
Lactose	72,54	0,42	172,71	42,42	1,81	23,43
Sacarose	29	0,37	78,37	4,4	0,31	14,19
Gelatina	27,5	3,13	8,79	8	1,91	4,60
Caseína	24,23	4,14	5,85	6,16	1,59	3,87

*Detalhes vide tabela 02.

Tabela 04: Determinação da melhor fonte de carbono para produção da protease extracelular e intracelular de *Scytalidium thermophilum*.

Fonte de Carbono 1%	U/ml (Extra)	mg/ml (Extra)	U/mg (Extra)	U/ml (Intra)	mg/ml (Intra)	U/mg (Intra)
Glicose	1053,89	0,55	1916,16	78,01	0,83	93,98
Palha de arroz	832,94	1,50	555,29	NP	NP	NP
Farelo de soja	745,92	0,95	785,17	104,02	1,51	68,88
Amido	572,09	0,45	1271,31	147,72	0,97	152,28
Farinha de centeio	536,52	0,51	1052	57,48	1,55	37,08
Bagaço de cana	305,67	0,90	339,63	NP	NP	NP
Farelo de trigo	295,17	0,57	517,84	NP	NP	NP
Sacarose	134	0,32	418,75	82,12	0,31	264,90
Caseína	74,82	2,31	32,38	22,17	3,99	5,55
Leite Desnatado	20,94	1,51	13,86	NP	NP	NP
Gelatina	15,60	3,58	4,36	4,65	1,27	3,66
Lactose	7,53	0,43	17,51	7,09	2,01	18,45

*Detalhes vide tabela 02.

4.1.2. Efeito da Concentração do Extrato de Levedura na Produção de Protease

As figuras 2 (A, B e C) apresentam os níveis de atividade total e específica em função da concentração de extrato de levedura no meio de cultivo para *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S.thermophilum*, respectivamente. Os resultados apresentados na figura 2 A e B mostraram um melhor nível de atividade total e específica nas culturas crescidas em meio contendo 0,4% de extrato de levedura.

Para o *Scytalidium* (Figura 2 C) a melhor produção proteásica (Unidades totais) foi obtida quando o meio foi suplementado com 0,8% de extrato de levedura, porém, a atividade específica para esta concentração foi de aproximadamente duas vezes menor em comparação com a atividade específica do meio suplementado com 0,4% de extrato de levedura, mostrando uma alta quantidade de proteínas no meio de cultivo. Devido a isso padronizamos que 0,4% de extrato de levedura em meio de cultura líquida é a melhor concentração para os três fungos produzirem a enzima extracelular, além de possuírem uma produção de proteínas baixa o que justifica a alta de suas atividades específicas, e possibilita teoricamente facilidade no procedimento futuro de purificação.

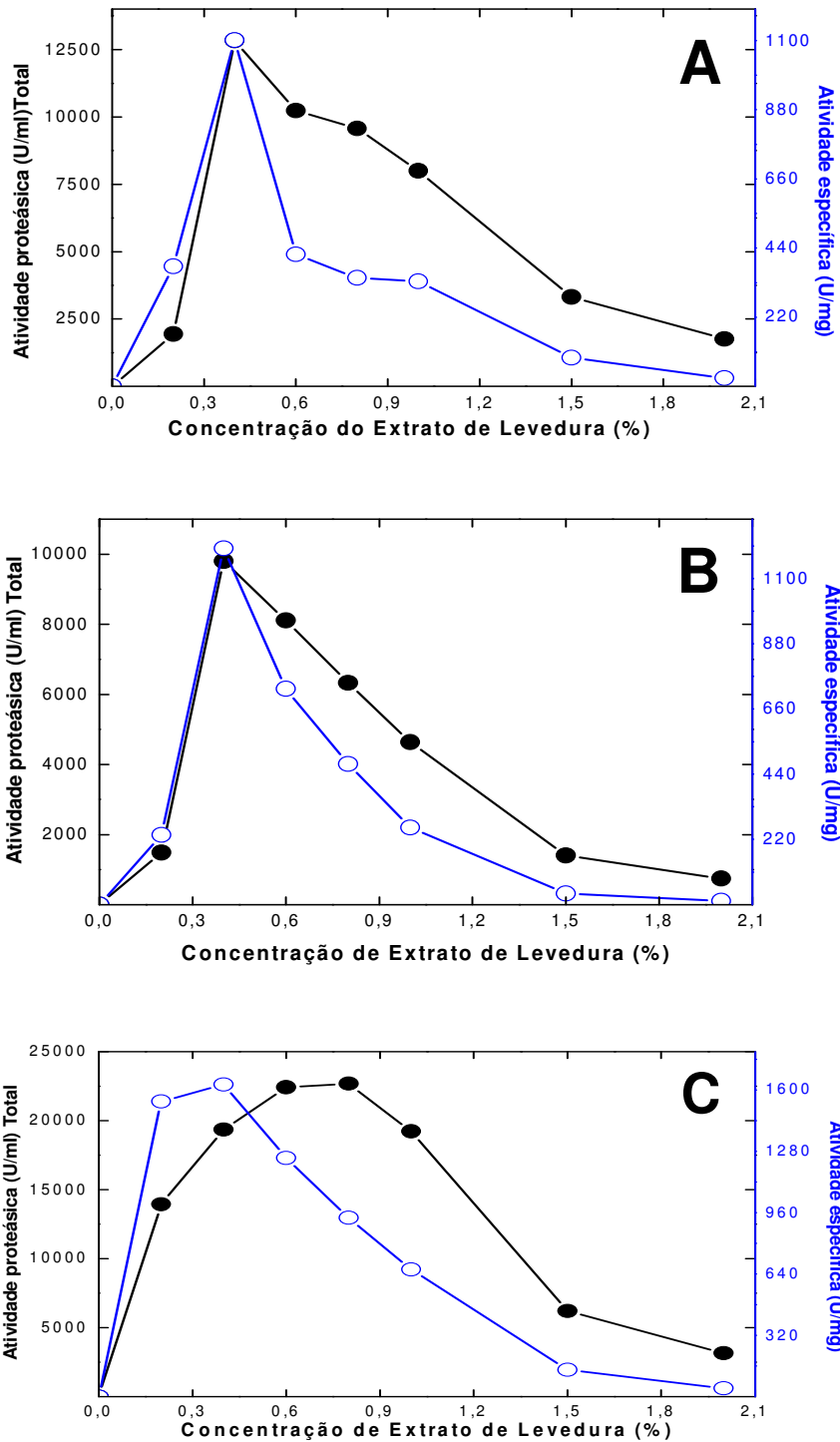


Figura 02: Efeito da suplementação com extrato de levedura no meio de cultura. Microrganismos cultivados em meios líquido composto de CaCl_2 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; glicose 1% e crescentes concentrações de extrato de levedura. Incubação a 40°C, por 72 h, 100 rpm. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

4.1.3. Determinação da Melhor Concentração de Glicose.

H. insolens (figura 3 A) alcançou o máximo de seu desenvolvimento quando a cultura foi suplementada com 1% de glicose, assim como o máximo da produção de protease pode também ser verificado para a mesma concentração da fonte de carbono. A atividade específica alcançada foi de 1409,54 U/mg, portanto a concentração de 1% foi padronizada como a mais adequada para prosseguir os estudos da atividade proteolítica deste microrganismo.

A cultura de *H. grisea var. thermoídea* (figura 3 B) pode alcançar o seu desenvolvimento máximo assim como o máximo da produção da enzima extracelular, quando o meio foi suplementado com 0,75% de glicose. A atividade específica obtida foi de 788,28 U/mg, logo a concentração de 0,75% foi a mais adequada para continuar os estudos.

Para *S. thermophilum* (figura 3 C) o desenvolvimento máximo deste microrganismo foi alcançado quando o meio foi suplementado com 1,5% de glicose, esta mesma concentração foi a responsável pela melhor produção enzimática quando comparada com os demais meios contendo as outras concentrações do açúcar, a atividade específica chegou a 1368,67 U/mg, dessa forma 1,5% de glicose foi determinada como a concentração ótima do açúcar para os experimentos que seguiram.

Portanto, as culturas padronizadas para a continuação destes estudos eram compostas de: CaCl₂ 0,1%; MgSO₄.7H₂O 0,05%; extrato de levedura 0,4% e 1% ; 0,75% ou 1,5% de glicose para *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum*, respectivamente.

A otimização das condições de cultivo para a melhor produção das proteases extracelulares constituiu de conhecimentos prévios fundamentais às etapas subseqüentes de desenvolvimento deste trabalho além de contribuírem para as comparações entre os fungos aqui estudados.

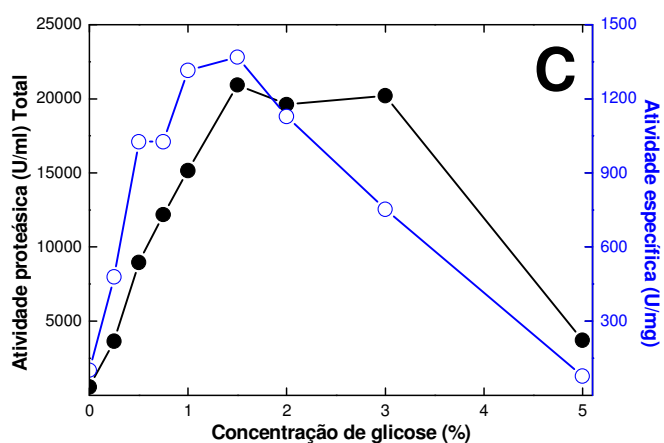
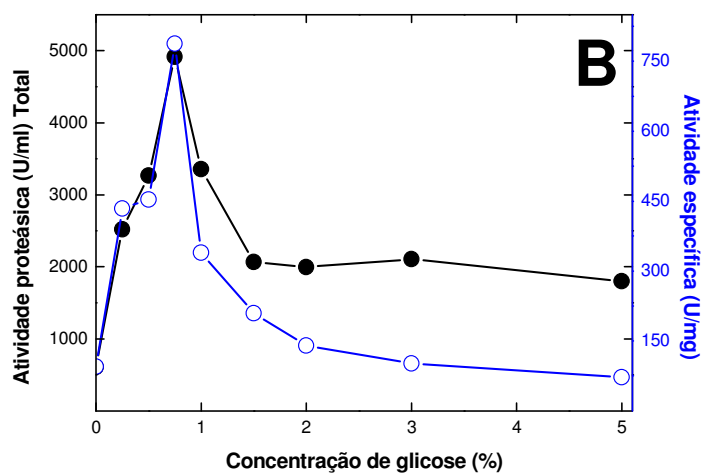
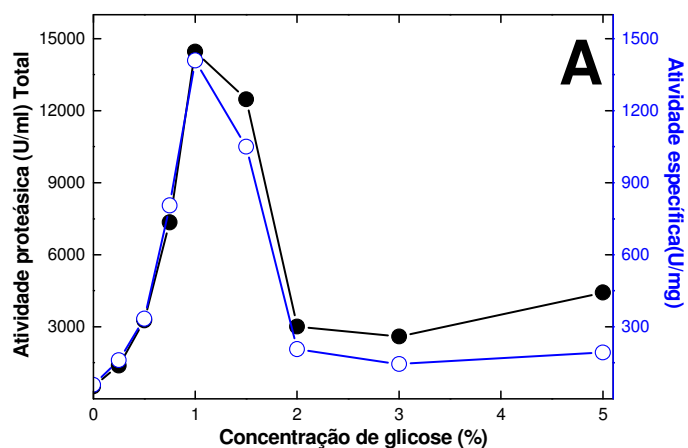


Figura 03: Efeito da suplementação com glicose no meio de cultura. Concentrações do açúcar foram variadas (0 a 5%). Composição do meio de cultura e tempo de incubação vide legenda figura 02. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

4.2. Determinação do Melhor Tempo de Cultivo Para a Produção de Protease

Para *H. insolens* (figura 4 A) constatamos um melhor nível de atividade proteásica quando as culturas apresentaram um tempo de crescimento de 72 h. A atividade total para este tempo chegou a 8930,08 U/ml totais (dado não mostrado). Os níveis de glicose advindos da fonte de carbono foram decaindo conforme o nível da produção enzimática foi crescendo.

Para *H. grisea var. thermoídea* (figura 4 B) verificamos um ótimo nível da atividade proteásica quando as culturas atingiram o estágio de 48 h de crescimento. A atividade total foi de aproximadamente 6965,79 U/ml totais (dado não mostrado). Os níveis de glicose provenientes da fonte de carbono decaíram nas primeiras 24 h, assim como para *H. insolens*. Após o consumo de quase toda a glicose do meio de cultivo um pico da produção de proteases extracelular foi observado.

Para *S. thermophilum* (figura 4 C) relatamos pico da atividade proteásica no momento em que as culturas chegaram a 96 h de crescimento. A atividade total foi 11948,40 U/ml totais (dado não mostrado). Os níveis de glicose decaíram apenas após 48 h, diferentemente dos outros dois microrganismos, o pico de atividade específica foi observado logo após a diminuição significativa dos níveis do açúcar.

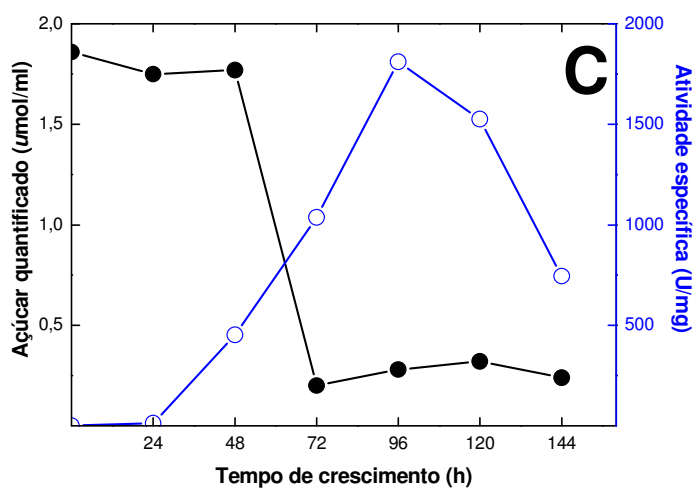
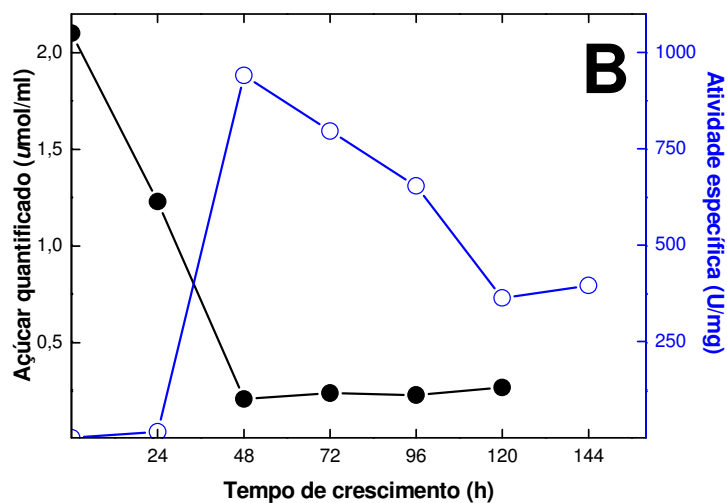
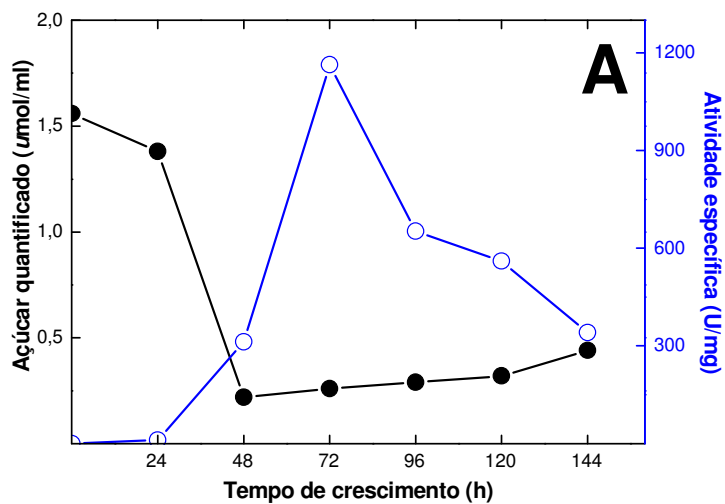


Figura 04: Determinação do tempo de cultivo. Microrganismo cultivado em meio líquido composto de CaCl_2 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; extrato de levedura 0,4% e glicose 1% (A), 0,75% (B) e 1,5% (C). Incubação a 40°C, por tempos variados, 100 rpm. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

4.3. Determinação da temperatura e pH ótimos de reação

A temperatura ótima aparente de reação para a protease de *H. insolens* (figura 5 A) e *S. thermophilum* (figura 5 C) foi 50°C.

Os resultados relatados para *H. grisea var. thermoídea* (figura 5B) foram diferentes dos dois fungos anteriores, este não possui uma temperatura ótima aparente bem definida e sim uma faixa que se estende de 45°C a 60°C.

Considerando que *H. grisea var. thermoídea* exibe proteases com uma faixa ampla de temperatura ótima (45°C a 60 °C) e as proteases dos dois outros organismos de 50°C, decidimos utilizar esta temperatura para os três fungos.

As figuras 6A e 6C inicialmente analisadas pareciam mostrar que os pHs ótimos das proteases extracelular de *H. insolens* e de *S. thermophilum* eram 9.5. Porém após uma verificação mais criteriosa constatamos que as enzimas aqui estudadas por nós sofrem interferência das características químicas e ou estruturais do tampão de reação e assim o pH ótimo aparente de reação delas são 8.0 e 7.5 para *H. insolens* e *S. thermophilum*, respectivamente. Para *H. grisea var. thermoídea* o pH ótimo aparente encontrado foi 8.5 (figura 6 B). O tampão Tris-Base foi o escolhido para os três microrganismos.

Os três tampões mostraram-se adequados para as atividades das proteases, porém o tampão Caps permitiu que as proteases de *H. insolens* e *S. thermophilum* atingissem uma maior atividade específica, já que essas enzimas são influenciadas pelas características dos tampões de reação.

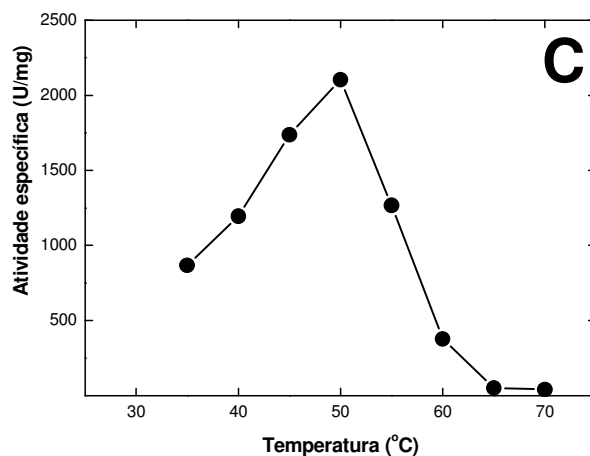
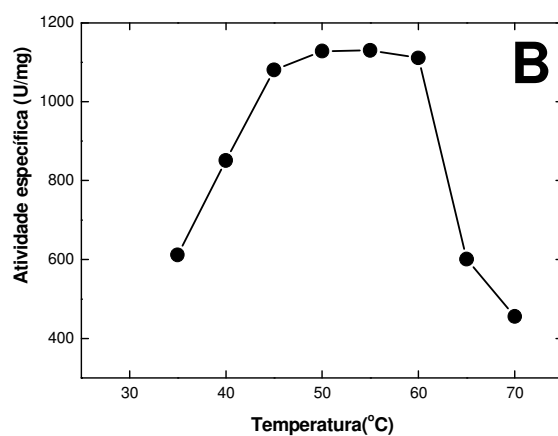
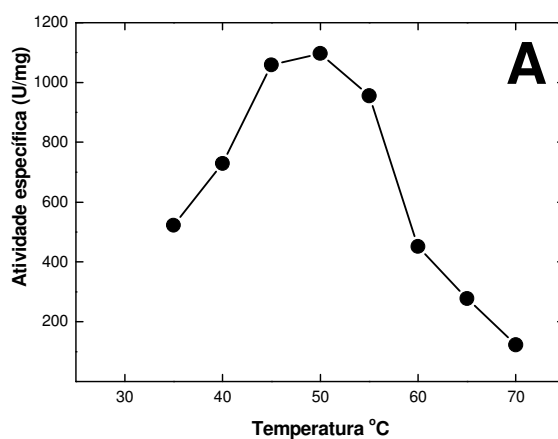


Figura 05: Determinação da temperatura de ensaio enzimático para amostra bruta. Composição do meio de cultura vide legenda Figura 04. Incubação a 40°C por 72h (A), 48 h (B) e 96 h (C), 100rpm. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

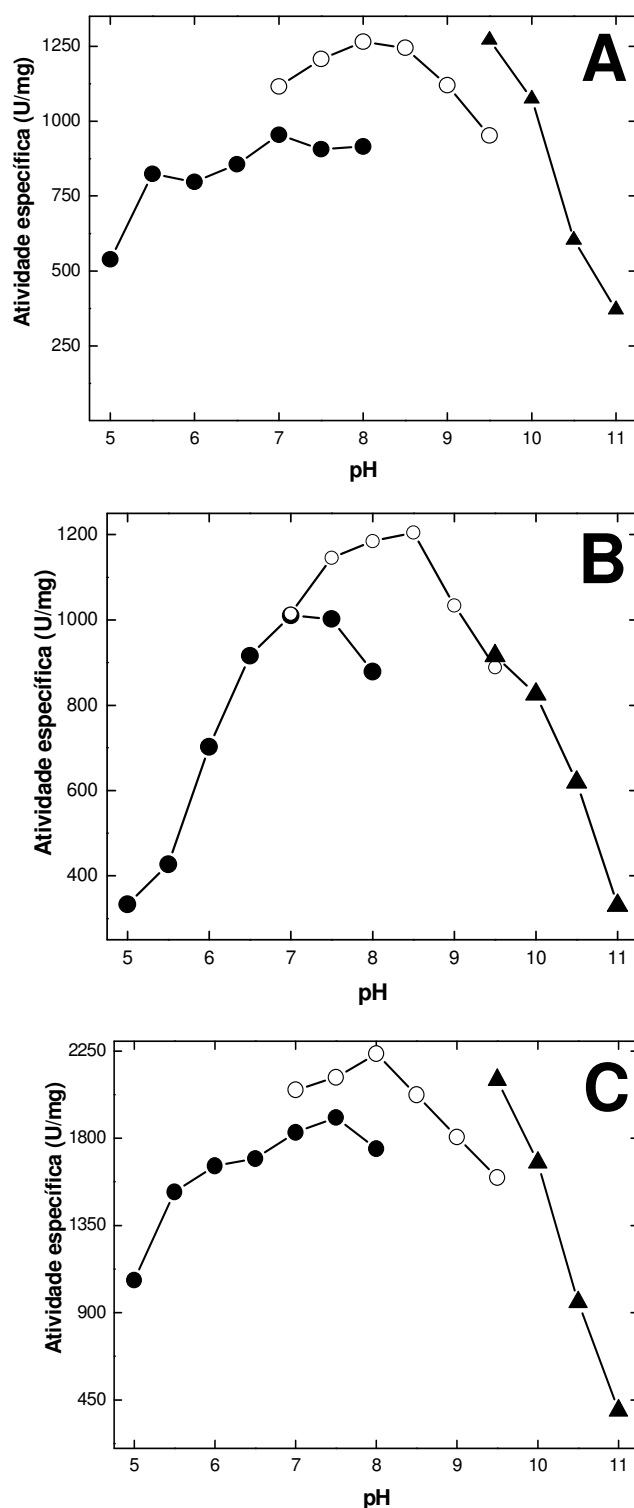


Figura 06: Determinação do pH de ensaio enzimático para amostra bruta. Composição do meio de cultura e tempo de incubação vide legenda figura 05. As amostras foram ensaiadas a 50°C. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*. (●) Tampão Mc Ilvaine, (○) tampão Tris-Base (▲)Tampão Caps.

4.4. Determinação da Termoestabilidade e Estabilidade ao pH

Para determinar a estabilidade das proteases frente à temperatura, o fungo foi crescido em meio previamente padronizado com 1% de glicose por um período de 72 h para o *H. insolens*, 0,75% de glicose por 48 h para *H. grisea var. thermoídea* e 1,5% de glicose por um período de 96 h para o *S. thermophilum* sob agitação constante de 100 rpm. A partir deste experimento todos os filtrados eram dialisados e utilizados como fonte das enzimas. Todos os filtrados de *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* foram incubados em meios aquosos de 40 °C a 70°C por até 60 min. Após esse período foram determinadas as atividades remanescentes.

Nas figuras 7 A, B e C podemos observar que a meia vida da protease extracelular incubada para o *H. insolens* a 50°C foi de 40 min, a 55°C foi de 12 min a 60°C, 65°C e 70°C a meia vida foi de 8 min. Os resultados ilustrados na figura 7 A mostram que por 1 h a enzima bruta de *H. insolens* manteve cerca de 83% e 70% de sua atividade nas temperaturas de 40 e 45°C, respectivamente. Para a enzima extracelular de *H. grisea var. thermoídea* constatamos ser a mais estável dos três microrganismos estudados. A figura 7 B ilustra que por 1 h a enzima bruta de *H. grisea var. thermoídea* permaneceu com aproximadamente 90% de sua atividade nas temperaturas de 40, 45, 50°C. Foram conservados 50% da atividade enzimática a 55°C por 60 min. A enzima exibiu uma meia vida de 20 min a 60°C e 8 min a 65°C e 70°C.

Para a protease do *S. thermophilum* a meia vida foi de 22 min a 55°C, 9 min a 60°C e 7min a 65 e 70°C. A figura 7 C mostra que por 1 h a protease bruta de *S. thermophilum* conservou cerca de 100%, 90% e 85% de sua atividade nas temperaturas 40, 45 e 50°C, respectivamente.

A figura 8 relata a estabilidade das proteases incubadas durante 1 hora a 4°C em pH de 3.0 a 13.0.

Em experimentos para verificar a estabilidade ao pH das enzimas estudadas neste trabalho, a faixa de pH variou de 3.0 a 13.0 para todos os microrganismos e o tempo de incubação foi de 1 h a 4°C. Para *H. insolens* (Figura 8 A) verificamos que

de 50 a 60% aproximadamente de sua atividade residual foi conservada nos pHs de 3.0 a 5.0. De 5.5 a 7.5 observamos uma retenção da atividade enzimática de 70%. De 8.0 a 9.5 a enzima possuiu uma atividade de 90% aproximadamente. Em pHs mais alcalinos 10.0 a 12.5 a atividade se manteve em 100% e chegou a 21% apenas quando a enzima foi exposta a pH 13.0.

A atividade residual enzimática de *H. grisea var. thermoídea* (Figura 8 B) foi mantida em aproximadamente 100% na faixa de pHs 3.0 – 12.5 e a enzima teve uma brusca perda de atividade quando exposta por 1 hora ao pH 13.0.

A protease de *S. thermophilum* (Figura 8 C) quando avaliada com relação à estabilidade ao pH a enzima foi estável durante o período de uma hora de incubação dos pHs 3.0 a 12.5 e assim como a de *H.grisea var. thermoídea*, teve uma brusca queda quando exposta ao pH 13.0.

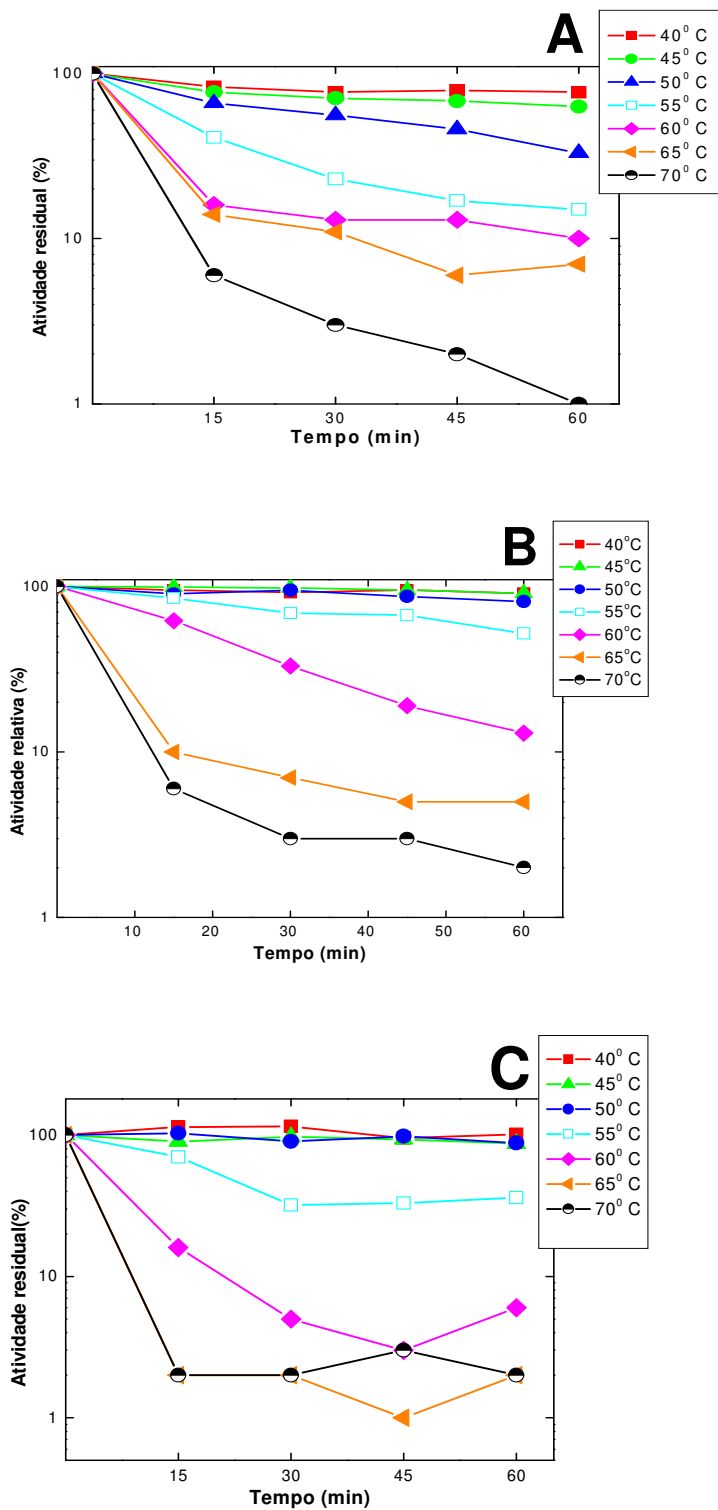


Figura 07: Determinação da termoestabilidade da amostra bruta. Composição do meio de cultura, tempo de incubação e condições de ensaio vide legenda figura 06. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*. Os extratos foram dialisados.

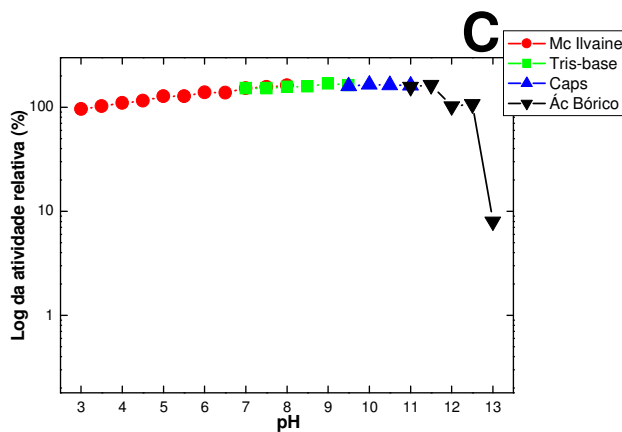
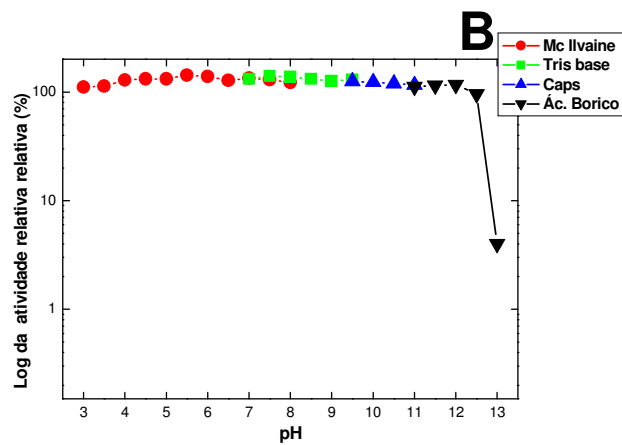
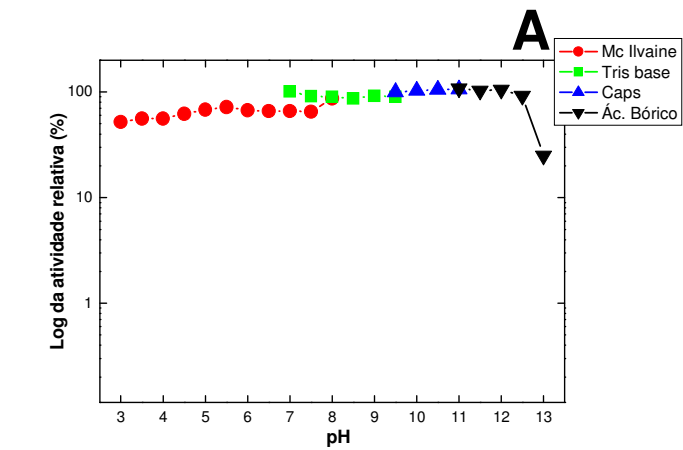


Figura 08: Determinação da estabilidade ao pH da amostra bruta. Composição do meio de cultura, tempo de incubação e condições de ensaio vide legenda figura 07. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

4.5. Determinação do tempo de estabilidade a pHs extremos.

Após verificarmos a estabilidade ao pH pelo período de 1 h das enzimas aqui estudadas e constatarmos uma ampla faixa de estabilidade em pHs extremos para os três microrganismos. Experimentos variando o tempo de incubação das enzimas em pHs muito ácidos ou muito básicos foram feitos, para verificar o tempo de estabilidade destas enzimas para pHs tão variados.

As figuras 9 (A, B e C) e 10 (A, B e C) ilustram os resultados para os tampões Mc Ilvaine e Ácido Bórico para *H. insoles*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum*, respectivamente.

Quando incubadas em tampão Mc Ilvaine pH 3.0 as proteases de *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* se mostraram estáveis de 0 a 6 h, porém as enzimas de *H. insolens* conservaram aproximadamente 50 % de sua atividade residual.

Ao submeter às enzimas extracelulares ao tampão Ácido bórico pH 11.0 verificamos estabilidade para todos os microrganismos aqui estudados do tempo 0 a 6 h.

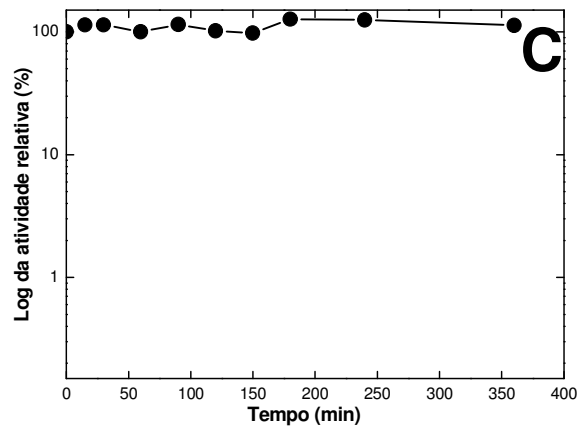
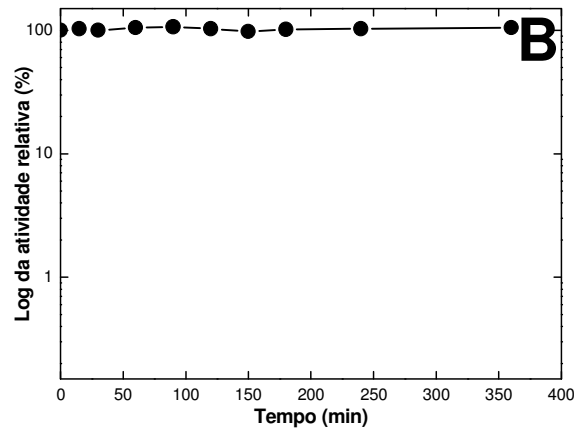
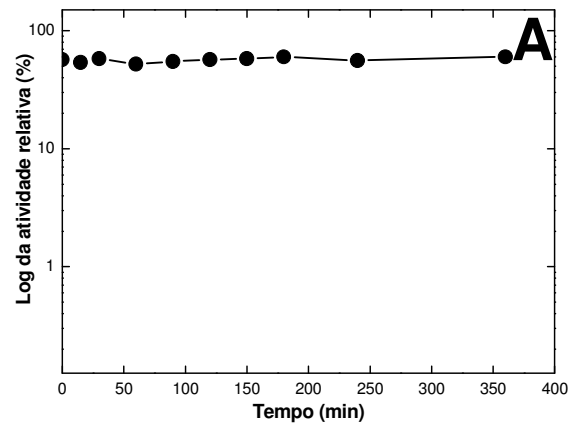


Figura 09: Determinação do tempo de estabilidade das proteases a pHs extremos. Tampão de incubação Mc Ilvaine pH 3.0. Outras informações vida legenda figura 07. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

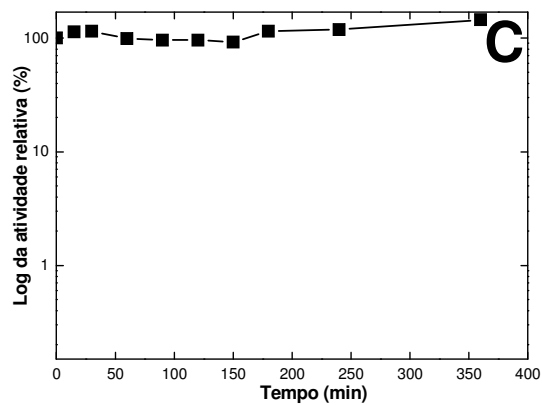
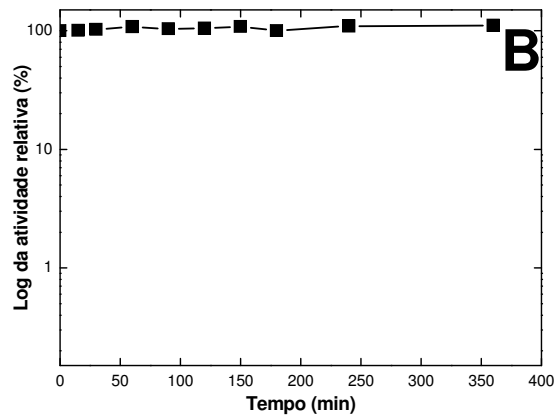
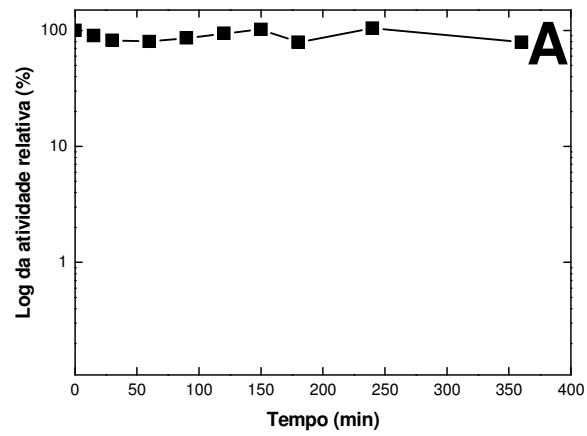


Figura 10: Determinação do tempo de estabilidade das proteases a pHs extremos. Tampão de incubação Ácido Bórico pH 11.0. Outras informações vida legenda figura 07. (A) *H. insolens*, (B) *H. grisea var. thermoidea*, (C) *S. thermophilum*.

4.6. Influência de íons, EDTA e β-mercaptoetanol sobre a atividade das proteases extracelulares brutas.

O efeito de íons metálicos, EDTA e β-mercaptoetanol na concentração de 1 mM, 10mM assim como a mistura dos efetores na concentração de 1mM foram testados em condições ótimas de temperatura e pH. As Tabelas 5, 6 e 7 resumem as atividades relativas observadas. O controle utilizado para o cálculo das atividades relativas dos três casos foi o EDTA, isso foi adotado para certificar a inexistência de quaisquer íons presentes no meio de cultivo.

Nos dados ilustrados na Tabela 5 verificamos que CaCl_2 , MgCl_2 , β-mercaptoetanol, NaCl , NH_4Cl_2 e BaCl_2 ativaram em: 87%, 59%, 88%, 79%, 72% e 79%, respectivamente as proteases produzidas por *H. insolens*. Os íons: CoCl_2 , HgCl_2 , AlCl_3 e ZnCl_2 inibiram a atividade da protease deste fungo em: 27%, 29%, 19% e 56% nesta ordem. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ causou uma inibição da atividade proteolítica de 100%. Para *H. grisea var. thermoídea* nesta mesma tabela, constatamos que nenhum dos íons testados ativaram a protease de forma significativa. Os íons: CoCl_2 , HgCl_2 , AlCl_3 , CuSO_4 e ZnCl_2 inibiram a atividade proteásica de *H. grisea var. thermoídea* em: 40%, 55%, 13%, 7% e 92%, respectivamente. Assim como no caso da atividade proteolítica de *H. insolens*, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ ocasionou a inibição total da enzima produzida por *H. grisea*. A protease produzida por *S. thermophilum* quando em presença de diferentes íons em baixa concentração mostrou-se altamente ativada por CaCl_2 (213%), MgCl_2 (128%), e β-mercaptoetanol (124%). Os íons NaCl , NH_4Cl_2 , BaCl_2 também ocasionaram uma boa ativação nas proteases oriundas de *S. thermophilum* e observamos um aumento de 118%, 99% e 86%, respectivamente. Os íons CoCl_2 e ZnCl_2 inibiram as proteases em 16% e 73%, respectivamente. $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ em baixas concentrações inibiu totalmente protease de *S. thermophilum*.

Ao submeter a atividade proteolítica do *H. insolens* a altas concentrações de β-mercaptoetanol (10 mM) verificou-se que a ativação foi cerca de 85% (Tabela 6). Os íons CaCl_2 , MgCl_2 , NH_4Cl_2 , BaCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 e CuSO_4 inibiram a atividade proteolítica da enzima deste microrganismo em: 17%, 8%, 11%, 29%, 73%, 47% e 78%, respectivamente.

Os íons HgCl_2 , AlCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 em altas concentrações inibiram a atividade enzimática de *H. insolens* em 100%.

Ao observar os resultados de atividade relativa para *H. grisea var. thermoídea* sobre altas concentrações iônicas (Tabela 6) verificamos que os íons: BaCl_2 , CoCl_2 , MnCl_2 e CuSO_4 inibiram a atividade da enzima em: 5%, 85%, 78% e 70%, respectivamente. Os íons HgCl_2 , AlCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 inibiram totalmente a atividade proteásica. Os demais íons não influenciaram na atividade relativa da enzima.

Para *S. thermophilum* (Tabela 6) constatamos que, em altas concentrações, quando a enzima é submetida aos efetores: CaCl_2 , MgCl_2 e β -mercaptoetanol a ativação é mantida, porém em níveis menores, do que quando é usada a concentração de 1mM destes efetores. Os íons: CoCl_2 , MnCl_2 e CuSO_4 inibiram a enzima em: 60%, 36% e 57%, respectivamente. A protease foi 100% inibida pelos íons HgCl_2 , AlCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 .

Experimentos para verificação da influência da mistura de efetores na atividade relativa das proteases produzidas pelos microrganismos aqui estudados foram feitos, os efetores misturados foram, CaCl_2 , MgCl_2 , EDTA e β -mercaptoetanol, esses foram escolhidos devido aos relevantes resultados obtidos nos experimentos anteriormente já apresentados.

Na tabela 7 relatamos os resultados das atividades relativas das misturas de efetores na concentração de 1 mM. Para *H. insolens* verificamos que a mistura de íons não foi favorável a ativação enzimática, quando os resultados são comparados as atividades relativas sob a influência dos íons sozinhos. Para *H. grisea var. thermoídea* a mistura de efetores ocasionou uma tímida ativação quando a enzima foi submetida a: $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol, $\text{Mg}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol e $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol. *S. thermophilum* produziu proteases que foram influenciadas pela mistura de efetores (Tabela 7) $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}$, $\text{Ca}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol, $\text{Mg}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol e $\text{Ca}^{2+}+\text{Mg}^{2+}+\beta$ -mercaptoetanol ativaram as enzimas em: 187%, 218%, 139% e 213%. Porém quando comparamos estes resultados com os de efetores sozinhos verificamos que CaCl_2 proporciona a mesma

ou até maior ativação do que a mistura de íons. Logo, relatamos que a mistura de íons é satisfatória para a ativação das proteases produzidas por *S. thermophilum*, porém submeter às enzimas a um íon sem mistura é mais favorável e menos trabalhoso no momento da dosagem da atividade.

No intuito de definir a melhor concentração de Ca^{2+} e Mg^{2+} a serem utilizadas para se obter o máximo de ativação das enzimas de *H. insoles* e *S. thermophilum*, foram realizadas dosagens enzimáticas na presença de crescentes concentrações destes íons (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 5 e 10 mM). Verificamos que na presença de 0,25 mM para o primeiro microrganismo e 1 mM de CaCl_2 (Figura 11 A e B) para o segundo as enzimas atingiram a máxima atividade. Para Mg^{2+} a máxima atividade foi observada nas concentrações de 0,5 mM para *H. insolens* (Figura 12 A) e 0,75 mM para *S. thermophilum* (Figura 12 B).

Tabela 05: Efeito de íons, EDTA e β -mercaptoetanol na concentração de 1 mM nos níveis de atividade proteásica.

Efetores	Ativ. relativa (%)	Ativ. relativa (%)	Ativ. relativa (%)
1mM	<i>Humicola insolens</i>	<i>Humicola grisea var. thermoídea</i>	<i>Scytalidium thermophilum</i>
Controle (EDTA)	100	100	100
CaCl₂	187	113	313
MgCl₂	159	108	228
β-mercaptoetanol	188	112	224
KCl	109	104	131
NaCl	179	104	218
NH₄Cl₂	172	109	199
BaCl₂	179	110	186
CoCl₂	73	60	84
HgCl₂	71	45	101
MnCl₂	101	116	104
AlCl₃	81	87	126
CuSO₄	104	93	106
Fe₂(SO₄)	0	0	0
ZnCl₂	44	8	27

Os valores apresentados na tabela correspondem à porcentagem de atividade em relação ao controle – 100% (ensaio enzimático realizado em presença de EDTA). Os fungos foram crescidos conforme legenda figura 05 e as condições de ensaio vide figura 06.

Tabela 06: Efeito de íons, EDTA e β -mercaptoetanol na concentração de 10 mM nos níveis de atividade proteásica.

Efetores 10mM	Ativ. relativa (%)	Ativ. relativa (%)	Ativ. relativa (%)
	<i>Humicola insolens</i>	<i>Humicola grisea var. thermoídea</i>	<i>Scytalidium thermophilum</i>
Controle (EDTA)	100	100	100
CaCl₂	83	109	276
MgCl₂	92	108	197
β-mercaptoetanol	185	112	224
KCl	102	107	136
NaCl	139	108	122
NH₄Cl₂	89	102	126
BaCl₂	71	95	118
CoCl₂	27	15	40
HgCl₂	0	0	0
MnCl₂	53	22	64
AlCl₃	0	0	0
CuSO₄	22	30	43
Fe₂(SO₄)	0	0	0
ZnCl₂	0	0	0

Os valores apresentados na tabela correspondem à porcentagem de atividade em relação ao controle – 100% (ensaio enzimático realizado em presença de EDTA). Maiores detalhes vide legenda tabela 05.

Tabela 07: Efeito da mistura de efetores na concentração de 1 mM nos níveis de atividade proteásica.

Efetores 1mM	<i>Humicola insolens</i>	<i>Humicola grisea var. thermoídea</i>	<i>Scytalidium thermophilum</i>
Controle (EDTA)	100	100	100
CaCl₂	187	109	313
MgCl₂	159	108	228
β-mercaptoetanol	188	112	224
Ca²⁺+Mg²⁺	115	123	287
Ca²⁺+βmer	85	124	318
Ca²⁺+EDTA	47	113	139
Mg²⁺+β-mer	122	128	239
Mg²⁺+EDTA	40	112	80
Ca²⁺+Mg²⁺+βmer	67	130	313

Os valores apresentados na Tabela correspondem á porcentagem de atividade em relação ao controle – 100% (ensaio enzimático realizado em presença de EDTA). As misturas de efetores foram feitas na concentração de 1 mM para cada componente. Demais informações vide legenda tabela 05.

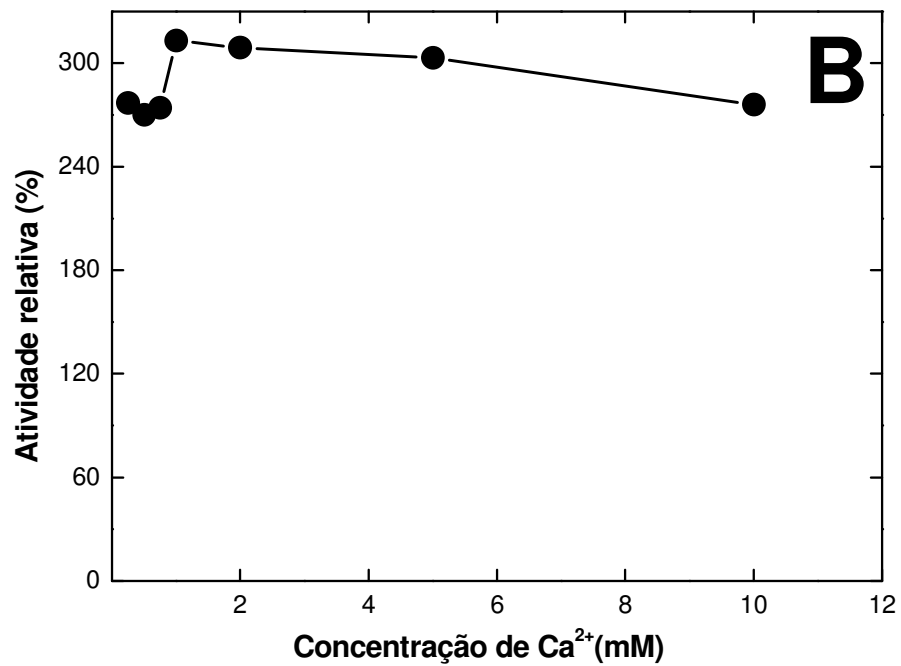
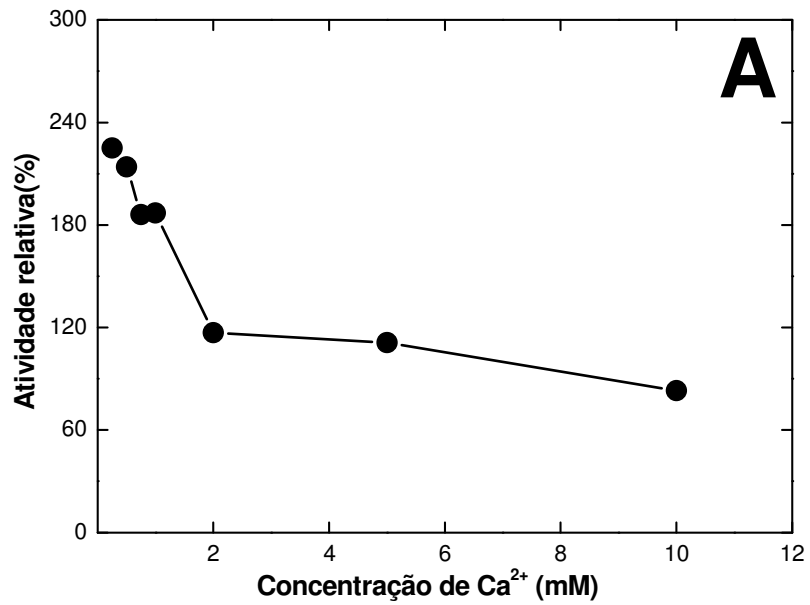


Figura 11: Determinação da concentração ótima do íon Ca^{2+} na atividade proteásica. Microrganismo cultivado em meio líquido composto de CaCl_2 0,1%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; extrato de levedura 0,4% e glicose 1% (A) e 1,5% (B). Incubação a 40°C por 72 h e 96 h, 100 rpm. Os extratos foram dialisados e as reações ensaiadas a 50°C e pH 8.0 e 7.5 para *H. insolens* (A) e *S. thermophilum* (B), respectivamente.

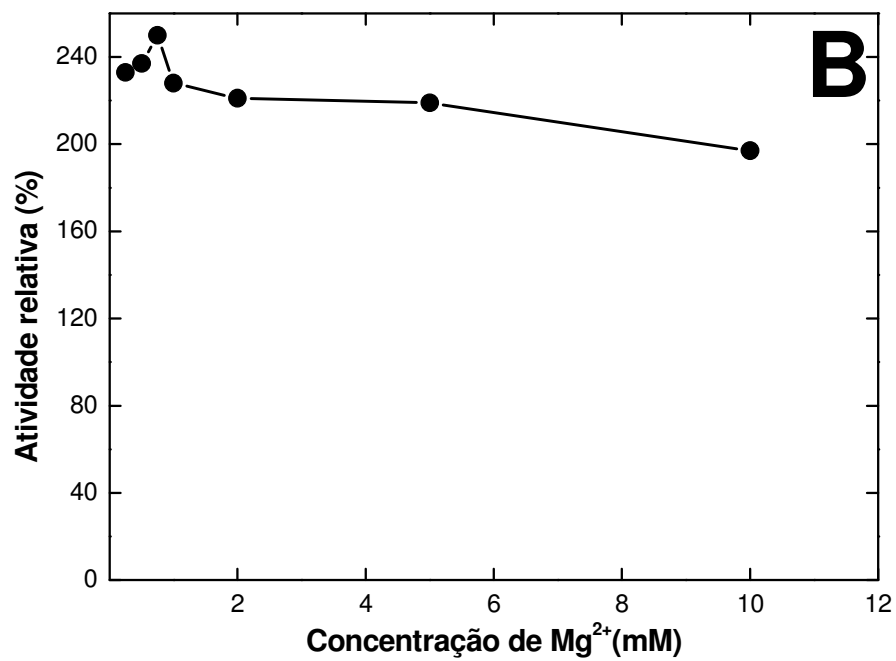
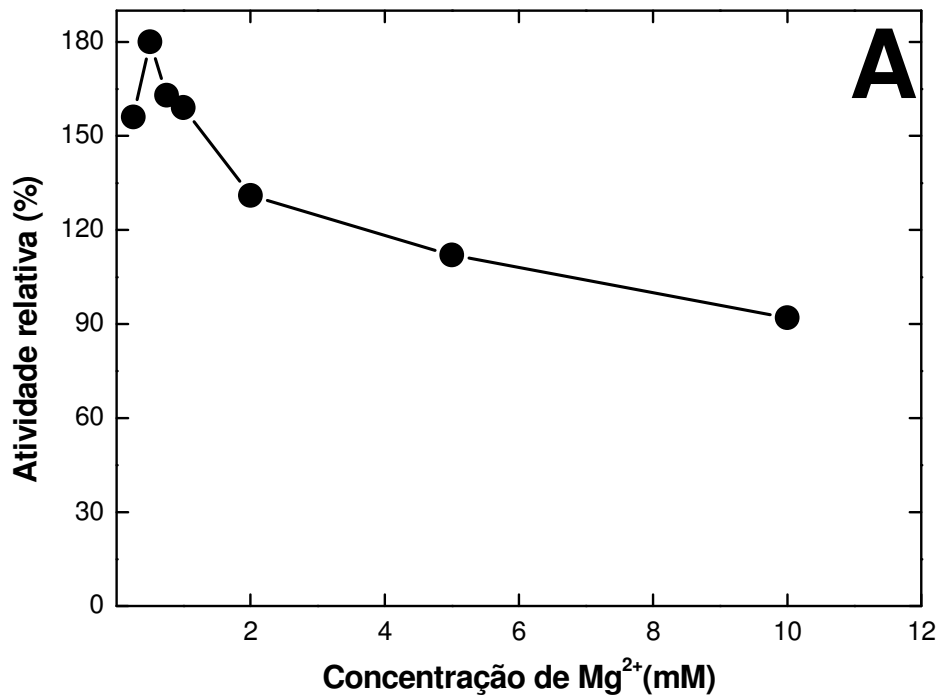


Figura 12: Determinação da concentração ótima do íon Mg²⁺ na atividade proteásica. (A) *H. insolens*, (B) *S. thermophilum*. Demais detalhes vide figura 11.

4.7. Diferenciação dos microrganismos através de zimograma.

No intuito de ilustrar as diferenças e as semelhanças existentes entre as linhagens e verificar o número de proteases produzidas por cada linhagem foi realizado PAGE. Após isso os géis foram cortados em 0,25 cm e foi realizado o teste de atividade em cada pedaço do gel para verificação da localização das proteases nele.

A figura 13 retrata a existência de algumas semelhanças e diferenças entre as proteases originárias dos três fungos aqui estudados. Verificamos que (Figura 13 A) existem três proteases para *H. insolens*, uma delas está localizada próxima da fração 5 do gel, a segunda protease tem seu pico máximo de atividade na fração 12 e por fim constatamos uma enzima final com máxima atividade na fração 28.

H. grisea var. thermoidea (figura 13 B) produz 4 proteases, uma inicial que é semelhante a existente em *H. insoles* e em *S. thermophilum* (Figura 13 C). Uma localizada na fração 12 também semelhante ao *H. isolens* (Figura 13 A). Nas proximidades da fração 25 há a existência de uma protease que diferencia este microrganismo dos demais, pois é inexistente para os fungos das figuras 13 A e C. Finalmente uma protease semelhante à protease final de *H. insolens* que está próximo da fração 28.

Na figura 13 C observamos que *S. thermophilum* se diferencia das linhagens acima pela produção de uma protease final na fração 32, além disso, ele produz duas enzimas localizadas inicialmente no gel uma nas proximidades da fração 5 comum a *H. insolens* e *H. grisea var. thermoidea* e outra na fração 8 inexistente nos demais microrganismos. A inexistência de uma banda proteolítica próxima na fração 28 é outra característica que diferencia *Scytalidium* dos outros dois fungos.

A Figura 14 é uma sobreposição dos géis aqui já descritos, para uma visualização abrangente dos resultados aqui apresentados.

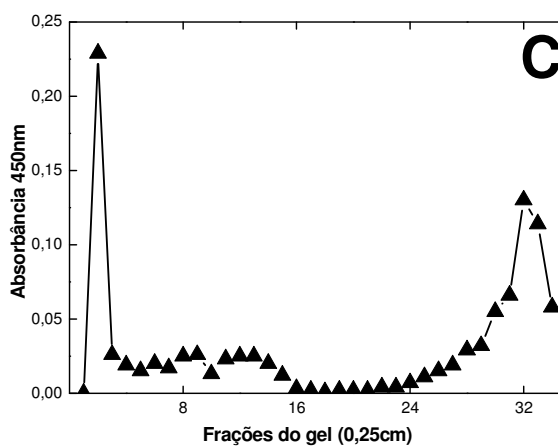
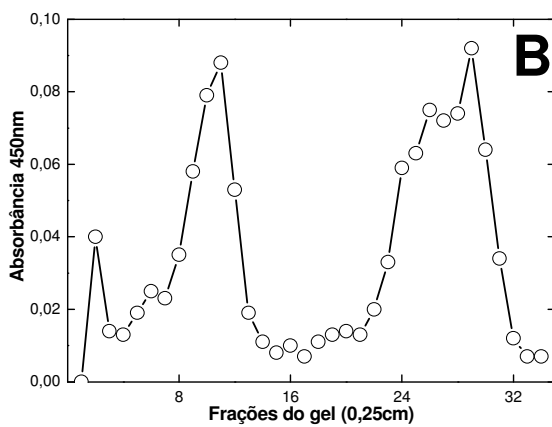
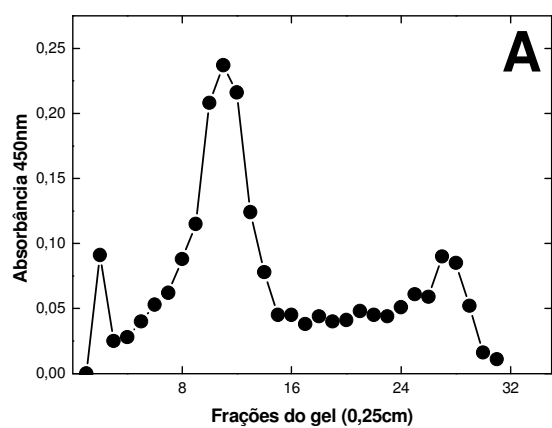


Figura 13: Determinação das proteases produzidas pelos fungos pós PAGE e atividade. Demais detalhes vide figura 11. *H. insolens* (A), *H. grisea var. thermoidea* (B), *S. thermophilum* (C), respectivamente.

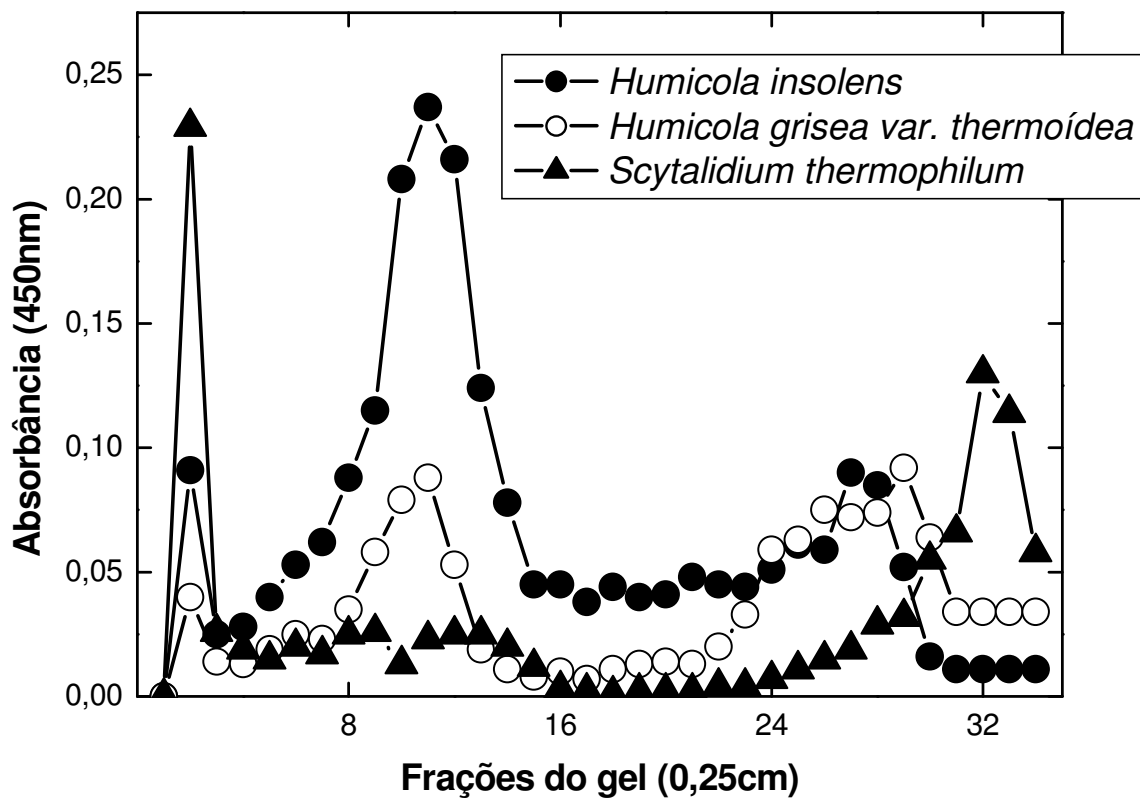


Figura 14: Sobreposição das proteases produzidas pelos fungos pós PAGE e atividade. Demais detalhes vide figura 11.

5. Discussão

Este trabalho representa um estudo inicial sobre a produção e caracterização bioquímica das proteases produzidas nos fungos termofílicos: *H. insolens*, *H. grisea* var. *thermoídea* e *S. thermophilum*.

Durante os últimos anos enzimas tem sido isoladas de organismos termofílicos capazes de sobreviver em ambientes de pHs extremos, altas temperaturas e estáveis contra uma variedade de agentes desnaturantes, para aplicação em processos industriais (Anwar & Saleemuddin, 1998). A biodiversidade constitui uma fonte inestimável para inovações biotecnológicas e favorece a procura por novos organismos para esta utilização (Said & Pietro, 2004).

A aplicação de proteases na indústria é bastante antiga, porém estas enzimas inicialmente foram extraídas de animais, e mais tarde de vegetais. Atualmente estudos com enzimas de origem microbianas estão dominando o mundo científico enzimológico, devido à facilidade de crescimento destes organismos e a não exigência de amplos espaços para cultivo.

Muitos estudos envolvendo proteases do gênero *Bacillus* sp. são encontrados na literatura, porém enzimas produzidas por bactérias possuem uma desvantagem pois, requerem um custo intensivo na metodologia de filtração para a obtenção do preparado de enzima livre de micróbios. Já as proteases de origem fúngica são vantajosas perante as de origem bacteriana devido ao fato do micélio ser removido facilmente por uma simples filtração (Anwar & Saleemuddin, 1998).

Em estudos previamente desenvolvidos durante a iniciação científica, a espécie *S. thermophilum* apresentou características fisiológicas interessantes e com alta aplicação biotecnológica. Pesquisas bibliográficas levaram-nos ao conhecimento da confusão taxonômica existente entre este microrganismo e os outros que compõem o chamado Complexo *Torula-Humicola*, por conseguinte todos estes fatores nos levaram ao desenvolvimento deste trabalho para um conhecimento inicial destes fungos, bem como de suas fisiologias e proteases produzidas.

Em estudos iniciais para otimização do meio de cultivo que foi utilizado para o crescimento dos fungos termofílicos aqui estudados e conseqüente obtenção de uma atividade proteásica máxima, foram testadas doze fontes de carbono diferentes, na concentração de 1%, entre elas: glicose, farinha de centeio, amido, farelo de trigo, lactose, farelo de soja, bagaço de cana, sacarose, caseína, gelatina e leite desnatado o meio também era composto de CaCl_2 0,1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%, extrato de levedura 0,4%. A máxima atividade proteásica extracelular para todos os microrganismos foi obtida quando o meio de cultura foi suplementado com glicose. Relatamos também que outras fontes de carbono foram eficientes para produção proteásica dos microrganismos. Porém, fomos surpreendidos ao compararmos a produção proteásica em meio suplementado com glicose e caseína para todos os fungos. Para este experimento parecia lógico que frente a uma fonte de proteína os microrganismos produziram proteases, porém o observado foi a baixa produção enzimática frente à proteína.

Suraia & Said (2002), relatam em seu livro “Enzimas de interesse industrial e biotecnológico”, que a produção de enzimas está sujeita a um controle negativo por repressão na presença de fontes de carbono prontamente metabolizáveis e de aminoácidos, mas também a um controle positivo que está relacionado com a esporulação.

Dados da literatura apontaram que linhagens de *Bacillus sp.* produtoras de proteases alcalinas são incubadas em meio de cultura suplementado com glicose 1% como fonte de carbono. (Genckal & Tari, 2006).

Relatos de purificação e caracterização de proteases termoestáveis de *Geobacillus sp.* YMTC 1049 mostraram o cultivo do microrganismo em meio basal contendo glicose por um período de oito horas. Posteriormente o meio inicial era suplementado com um meio B contendo caseína como fonte de carbono (Zhu *et al.*, 2007). Foi relatado que as fontes de carbono e de nitrogênio interferem na produção e na secreção de enzimas como, por exemplo, amilases e proteases (Cereia *et al.*, 2000; Hanson & Marzluf, 1975) .

O fato dos fungos termófilos aqui estudados não serem efetivamente induzidos pela presença de uma proteína (caseína) como fonte de carbono, sugerem que a enzima produzida por glicose possa estar envolvida na diferenciação celular destes microrganismos.

Dados da literatura sugerem que para alguns organismos, as proteases não têm um papel essencial no processo de desenvolvimento e nutrição das células, mas devem estar correlacionadas com a esporulação (Suraia & Said, 2002).

Glicose e farinha de centeio foram boas fontes de carbono para produção proteásica intracelular de *H. insolens* seguidas por amido e farelo de trigo. Já *H. grisea var. thermoídea* atingiu a máxima produção da enzima intracelular quando exposto a fontes de carbono glicose e farelo de soja. Amido, farelo de soja e glicose foram às fontes de carbono que melhor permitiram que *S. thermophilum* produzisse proteases intracelulares, respectivamente.

Para o *H. insolens* a atividade extracelular proteásica quando o meio foi suplementado com glicose foi de 558,14 U/ml, farinha de centeio foi a segunda melhor fonte chegando a uma atividade de 479,93 U/ml. O que chama bastante a atenção neste experimento é que o meio suplementado com bagaço de cana se mostrou também favorável a produção de protease extracelular atingindo uma atividade de 105,06 U/ml.

Já a caseína, para este microrganismo não permitiu uma boa produção de protease extracelular quando comparada às fontes já citadas, o valor de sua atividade proteásica atingiu 31,69 U/ml. A glicose revelou-se uma fonte aproximadamente vinte vezes melhor que a caseína.

Por isso, acreditamos que a glicose presente no meio de cultura dos termófilos é de extrema importância para o crescimento e desenvolvimento do microrganismo. Após consumir a glicose existente no meio e considerável crescimento dos microrganismos, os meios de culturas se tornam escassos para obtenção de alimento e contínua sobrevivência e proliferação. Com isso, o microrganismo, seja *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* ou *S. thermophilum*, em uma tentativa desesperada para alimentar-se e continuar vivendo, excreta todas as enzimas

possíveis para degradar outras “fontes de carbono” que por ventura pudessem existir no meio de cultivo. Outra possibilidade interessante é que as proteases estejam vinculadas ao processo de esporulação, pois logo após o término da glicose ocorre uma intensa pigmentação.

H. grisea var. thermoidea apresentou atividade proteásica extracelular de 544,05 U/ml quando o meio foi suplementado com glicose, 435,78 U/ml quando a fonte de carbono foi amido. Ao observar o experimento referente a bagaço de cana a produção da atividade proteásica atingiu 188,48 U/ml. Sugerindo que bagaço de cana pode ser utilizado para a produção proteásica, favorecendo o custo de produção que se tornou economicamente viável uma vez que a fonte de carbono é um resíduo agro-industrial em abundância na região. Ao suplementar o meio de cultivo com caseína obtivemos uma produção da enzima de 24,23 U/ml, sendo essa a fonte de carbono que menos favorece a produção de proteases quando comparada as demais testadas. A glicose mostrou ser uma fonte vinte e duas vezes melhor para a produção de proteases quando comparada a fonte protéica caseína.

Para o *S. thermophilum* a atividade extracelular da protease ao suplementar o meio de cultura com glicose foi de 1053,89 U/ml. Palha de arroz foi a segunda melhor fonte chegando a uma atividade de 832,94 U/ml. O meio suplementado com bagaço de cana também foi muito favorável à produção de proteases extracelular, sua atividade foi de 305,67 U/ml. Já a caseína proporcionou uma atividade proteásica de 74,82 U/ml. A glicose revelou-se uma fonte de carbono aproximadamente quatorze vezes melhor do que a caseína. Resultados semelhantes a esse foram obtidos por Amoozegar *et al.*, 2007 em estudo de produção de uma alcalina metaloprotease em bactéria regularmente halófila *Salinivibrio sp.* Neste organismo foi verificada uma alta produção proteásica em meio suplementado com glicose.

Ao observarmos as atividades das proteases produzidas pelos três fungos notamos que *S. thermophilum* produz duas vezes mais enzima que *H. insolens* e *H. grisea var. thermoidea*. Os dois últimos produzem um nível próximo de atividade protelolítica. Com base nos resultados apresentados, *S. thermophilum* é o melhor produtor de protease extracelular entre os microrganismos aqui estudados.

O fungo *S. thermophilum*, se mostrou um ótimo produtor de proteases e estudos realizados em nosso laboratório, mostraram que este microrganismo também é bom produtor de glucoamilase extracelular (Aquino *et al.*, 2001; Aquino *et al.*, 2003), trealase (Kadowaki *et al.*, 1996) e fosfatase alcalina (Guimarães *et al.*, 2001).

A fim de adequar o meio líquido utilizado na produção proteásica experimentos suplementando o meio de cultura com diferentes concentrações de extrato de levedura foram feitos. Verificamos que até a concentração de 0,4%, conforme aumentamos as concentrações de extrato, os níveis de atividade proteásica nos meios para todos os fungos cresceu. Sendo que na concentração de 0,4% obtivemos a produção máxima de protease para todos os microrganismos. Ao aumentarmos as concentrações acima de 0,4% pudemos observar um decréscimo nos níveis de atividade enzimática. Na adição de 2% de extrato de levedura a produção proteásica foi de aproximadamente igual a zero. É sabido que fungos termofílicos exigem para o seu crescimento algumas substâncias complexas (Cooney & Emerson, 1964). O extrato de levedura é rico em aminoácidos livres, minerais e vitaminas do Complexo B, sendo um elemento eficiente para ser utilizado em meios de cultura.

Os fungos termofílicos exibem uma alta síntese de degradação de proteínas (Cooney & Emerson, 1964) e conseqüentemente necessitam de uma rápida substituição destas proteínas degradadas, “turnover”. A esporulação e emissão conidial de microrganismos são dependentes de um intenso “turnover”, as proteases são responsáveis indiretamente por este evento celular em microrganismos, uma vez que são elas as responsáveis pelo “turnover” (Rao *et al.*, 1998). Com tudo, adequar a concentração de extrato de levedura ao meio de cultura para uma ótima produção proteásica é de intensa importância não apenas para uma rentável obtenção da enzima e aplicação biotecnológica uma vez que estas enzimas podem estar indiretamente envolvidas com a esporulação dos microrganismos e diferenciação celular.

O fato de que alta concentração de extrato de levedura diminui a produção de proteases nos termófilos, aqui estudados, é concordante com a nossa hipótese de que suas proteases sintetizadas podem estar relacionadas mais com a esporulação

do que com a utilização de proteínas. Pois, em altas concentrações de extrato de levedura há também um retardo da esporulação.

Outro fator que influencia no desenvolvimento dos microrganismos e conseqüente produção das enzimas é a concentração adequada da fonte de carbono utilizada, que no caso é a glicose. Inicialmente os experimentos desenvolvidos foram feitos com a concentração de 1% de glicose como fonte de carbono. Posteriormente alteramos a concentração de glicose do meio de cultura com o objetivo de obter uma melhor produção proteásica.

Ao adicionarmos as concentrações de glicose de *H. insolens* a partir de 0,25% observamos um aumento na produção enzimática que culminou em um pico máximo de produção na concentração de 1%, posterior a está, os níveis de produção proteásica decresceram. Ao adicionar 5% de glicose ao meio de cultivo observamos uma inibição do crescimento do microrganismo.

Resultados semelhantes foram notados para *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* porém os picos máximos de produção foram observados nas concentrações de 0,75% e 1,5%, respectivamente. Organismos usualmente podem sofrer repressão catabólica da síntese de enzimas (regulação negativa) (Nelson & Cox, 2000). Verificamos que a concentração de glicose interfere na produção de protease para os fungos aqui em questão ao ultrapassar 2% ocorre uma queda brusca na produção da enzima. Concentrações muito grandes de glicose 5% podem alterar a viscosidade do meio de cultura, com a diminuição da água livre, e dessa forma diminuir a aeração, com isso a repressão do crescimento dos organismos pode ocorrer.

Os outros elementos que constituíram o meio de cultivo aqui utilizado foram determinados através de meios já padronizados em nosso laboratório e com trabalhos encontrados na literatura em que CaCl_2 provavelmente utilizado como um cofator, para a sinalização celular da enzima, e MgSO_4 como cofator e fonte de enxofre (Haji *et al.*, 2007; Genckal & Tari, 2006; Zhu *et al.*, 2007).

O tempo durante o qual um microrganismo permanece incubado influencia fortemente em sua produção enzimática, uma vez que a incubação por um período muito curto ou muito longo pode não resultar na produção máxima que o organismo

é capaz. Os microrganismos têm seu melhor tempo de crescimento e produção proteásica diferente uns dos outros.

Para *H. insolens* a melhor produção enzimática foi obtida quando o microrganismo atingiu o tempo de incubação de 72 horas. Já para *H. grisea var. thermoídea* o pico de produção foi obtido em 48 horas. Ao observarmos a produção enzimática de *S. thermophilum* verificamos que o tempo de incubação ótimo para a melhor produção proteásica foi de 96 horas. Para *Aspergillus clavatus* ES1 a melhor produção enzimática foi obtida em 72 horas assim como para *Aerobasidium pullulans* (Hajji *et al.*, 2007; Donaghy & McKay, 1993), já para *Thermoascus aucarantiacus* o melhor tempo de incubação foi de 96 horas (Merheb *et al.*, 2006). Quando incubado por um período menor que o necessário o microrganismo produz pouca ou nenhuma enzima devido ao fato de estar em uma fase de adaptação ao meio de cultivo. Se o período de incubação ultrapassa o tempo de cultivo ótimo, às condições do meio de cultura se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células começam a se reproduzir mais lentamente. Células mortas começam a aumentar em número, nessa fase o meio pode estar deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos.

Como já comentado anteriormente a glicose quando presente em meio de cultura pode influenciar uma repressão catabólica do microrganismo. Dessa forma, experimentos para quantificar a existência de açúcares no meio de cultura durante a fase de incubação dos microrganismos foram feitos, a fim de conhecermos melhor a fisiologia destes fungos.

Para *H. insolens* após as primeiras 48 horas, a concentração de açúcar existente no meio de cultivo foi de menos de 0,2 $\mu\text{mols/ml}$ a máxima produção enzimática se deu em 72 horas, posterior a queda nos níveis de açúcar do meio de cultura. Para *H. grisea var. thermoídea* observamos que a queda da concentração de glicose ocorreu juntamente com o pico de produção ótima proteásica em 48 horas, e por fim *S. thermophilum* teve seu pico máximo de produção proteásica em 96 horas de incubação, vinte quatro horas após as quantidades de açúcar existentes no meio chegarem próximas a zero.

Estes resultados deram suporte maior à suspeita anteriormente por nós levantada de que a glicose, na verdade estaria envolvida com o crescimento dos microrganismo. Degradada esta glicose permitindo o crescimento dos fungos e a escassez de fonte de carbono, os microrganismos excretaram proteases assim como outras enzimas.

H. insolens, e *S. thermophilum* são semelhantes fisiologicamente quanto à produção de proteases frente ao meio suplementado com glicose, principalmente porque esta produção para os dois microrganismos é atingida apenas após 24 horas da queda dos níveis do açúcar no meio de cultivo. Este resultado foi curioso, uma vez que esperávamos que *H. insolens* tivesse semelhança maior com *H. grisea var. thermoídea* devido ao fato de pertencerem ao mesmo gênero. Porém frente ao meio de cultivo contendo glicose *H. grisea var. thermoídea* produz proteases concomitante com a queda dos níveis do açúcar.

Após a determinação das melhores condições de incubação para obtenção da enzima bruta, os parâmetros físico-químicos para verificação da atividade ótima das enzimas foram também padronizados e comparados para os microrganismos entre eles: temperatura e pH ótimos de reação, termoestabilidade e estabilidade ao pH. Foram utilizadas as amostras dialisadas produzidas de acordo com o meio padronizado já descrito.

A temperatura ótima de reação para *H. insolens* e *S. thermophilum* foi de 50°C, já para *H. grisea var. thermoídea* observamos a existência de uma faixa ótima de temperatura que se estendeu de 45°C a 60°C. Para o fungo nemátoda *Hirsutella rhossiliensis* resultados apresentados na literatura em estudos de proteases com propriedades nematocida mostraram que a temperatura ótima para os ensaios destas enzimas foi de 45°C (Wang *et al.*, 2007). O mesmo resultado para as proteases de *H. rhossiliensis* foi observado para as proteases produzidas em meio no estado sólido por *Penicillium sp* e com alta aplicabilidade a indústria de detergentes (Germano *et al.*, 2003). Já para a enzima extracelular produzida por *Aspergillus fumigatus* a temperatura ótima de reação foi de 40°C (Wang *et al.*, 2005).

O pH ótimo de reação para *H. insolens* foi de 8.0, para *H. grisea var. thermoidea* foi de 8.5 e para *S. thermophilum* foi de 7.5. Resultados semelhantes foram obtidos ao verificar a literatura, a protease de *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20) uma industrial protease importante que possui pH ótimo de 8.5 (Anwar & Saleemuddin, 1998). Estudos com proteases extracelulares de *Lactobacillus helveticus* revelaram um pH ótimo de 7.0. A caracterização de uma alcalina protease de *V. fluvialis* VM10 aplicada como aditivo em sabões para lavar roupa resultou em um pH ótimo de 8.0 (Valasaki *et al.*, 2008; Venugopal & Saramma, 2006).

A resistência ao calor é uma característica altamente desejável, preservando as enzimas contra inativação térmica e facilitando o manuseio e o transporte. A busca por enzimas estáveis a altas temperaturas cresce todos os anos. Esta importante característica tornou atrativos os estudos de organismos termofílicos nos últimos anos e incentiva contínuas pesquisas sobre outros organismos termofílicos ainda não estudados.

Os fungos termófilos são resistentes ao calor, (Cooney & Emerson, 1964) por esse motivo conhecer a estabilidade térmica enzimática é de extrema importância, pois isso determinará se uma enzima é industrialmente aplicável ou não.

A protease alcalina de *C. coronatus* (NCL 86.8.20) com compatibilidade para utilização na indústria de detergentes apresentou estabilidade térmica de uma hora quando incubada em uma temperatura de 40°C, porém quando incubada durante o mesmo período a 50°C a enzima tornou-se completamente inativa (Bhosale *et al.*, 1995). Em estudos de caracterização e estabilidade da protease de *Penicillium sp* produzida por fermentação em estado sólido para aplicação industrial em detergentes, verificamos que temperaturas maiores que 50°C diminuiriam significativamente a atividade residual enzimática e que a 28°C 100% da atividade residual foi conservada depois de três dias (Germano *et al.*, 2003).

Na caracterização de uma serino protease neutra de *H. rhossiliensis* com propriedades nematocidas observamos que a enzima foi sensível a temperatura, após purificação os resultados obtidos revelaram que 73 e 55% da atividade inicial da enzima foram mantidas após 10 min e 40 min a 45°C (Wang *et al.*, 2007).

Resultados semelhantes à protease de *C. coronatus* (NCL 86.8.20) foram obtidos por nós. Os fungos aqui estudados exibiram estabilidade a 40°C por 1 h. A

50°C, com exceção das enzimas de *H. insolens*, as proteases de *H. grisea* var. *thermoídea* e *S. thermophilum* continuaram estáveis conservando 90% de suas atividades. Diferente disso a protease de *C. coronatus* (NCL 86.8.20) a 50°C torna-se inativa (Bhosale *et al.*, 1995).

Ao compararmos quanto à estabilidade térmica a enzima originária de *Penicillium* sp. e dos fungos termofílicos aqui relatados observamos que para *Penicillium* sp. temperaturas maiores que 50°C diminuíram a atividade residual proteásica (Germano *et al.*, 2003). Quando expostas a esta mesma temperatura as enzimas de *H. insolens*, *H. grisea* var. *thermoídea* e *S. thermophilum* como já descrito conservavam pelo menos 50% de sua atividade residual quando não aproximadamente 90% e 85% dependendo do microrganismo.

Outros resultados literários já descritos a cima continuam a sugerir que as proteases aqui padronizadas possuem uma ótima estabilidade térmica e podem ser aplicadas na indústria.

Comparando as proteases de *H. insolens*, *H. grisea* var. *thermoídea* e *S. thermophilum* pudemos verificar que as termoestabilidades delas são diferentes. *H. grisea* var. *thermoídea* foi o fungo mais estável a temperatura, conservando por 60 min a 55°C aproximadamente 50% de sua atividade remanescente. O fungo menos termoestável comparado aos demais estudados neste trabalho foi *H. insolens* que conservou 83% e 70% de sua atividade residual a 40°C e 45°C, respectivamente.

Enzimas com alta estabilidade á desnaturação térmica e química são extraídas a partir de organismos com hábito termofílico ou termotolerante. Segundo Carrea & Colombo (2000), a maioria das enzimas atualmente utilizadas em processos industriais são obtidas de organismos mesofílicos, por sua menor estabilidade em temperaturas elevadas, a aplicação dessas enzimas é restrita. Para produzir uma enzima termoestável o microrganismo necessita de adaptações à termofilia envolvendo aspectos cruciais, como ajustamento da membrana citoplasmática, estabilidade das proteínas e do DNA as temperaturas acima da faixa mesofílica (Gomes *et al.*, 2007).

Uma importante vantagem que deve ser lembrada quando se trabalhar com enzimas termoestáveis é que muitos processos industriais se desenvolvem acima de 60°C e apresentam menor risco de contaminação, porém para que isso possa ser feito as enzimas que nele são aplicadas não podem se desnaturar em temperaturas elevadas (Said & Pietro, 2004).

A indústria de detergentes é uma das grandes interessadas em proteases termo- e alcali estáveis, mas enzimas proteolíticas com essas características também vêm sendo aplicadas na indústria têxtil de lã, onde são adicionadas para aumentar o grau de clareamento e incorporação subsequente de corantes nos fios (Said & Pietro, 2004).

Assim como a termoestabilidade, outra importante desejável característica enzimática é a estabilidade a uma ampla faixa de pHs.

Pesquisas literárias revelaram, em estudos sobre parcial caracterização de uma protease de um fungo termofílico, *T. aurantiacus*, e sua atividade hidrolítica sobre a caseína bovina que a enzima estudada foi estável em uma ampla faixa de pH, possuindo alta atividade de 3.0 a 9.5, contudo acima ou abaixo destes valores a atividade era perdida (Merheb *et al.*, 2006). Já para *H. rhossiliensis* a neutra serino-proteases foi estável nos pHs 5.0 e 6.0 por até duas horas, porém em pHs 4.0 e 7.0 apenas 20% da atividade da enzima foi retido em um mesmo período de incubação (Wang *et al.*, 2007). Em estudos de caracterização e purificação de proteases de *Dactylella shizishanna*, apenas 37,5% da atividade original foi retida em pH 5.0. A enzima pareceu ser estável em condições alcalinas com 73% da atividade retida durante 2 horas exposta a valores de pH 8.0 a 12.0 (Wang *et al.*, 2006).

Variando a faixa de pH dos fungos estudados neste trabalho de 3.0 a 13.0 notamos que *H. grisea var. thermoidea* e *S. thermophilum* são mais estáveis em pHs ácidos quando comparados a *H. insolens*. A atividade residual foi mantida 100% de 3.0 – 12.5 para *H. grisea var. thermoidea* e *S. thermophilum*, já para *H. insolens* o mesmo resultado foi verificado porém na faixa de pH de 10.0-12.5. Cinquenta a sessenta por cento aproximadamente da atividade residual enzimática do último fungo foi conservada nos pHs de 3.0 a 5.0. Constatamos que diferente de *H. grisea*

var. thermoídea e *S. thermophilum* as enzimas de *H. insolens* conservam maior atividade residual em uma faixa alcalina de pH.

Ao compararmos estes fungos quanto a estabilidade ao pH notamos que *H. grisea var. thermoídea* é semelhante a *S. thermophilum* e os dois se diferem de *H. insolens*.

Quando incubadas por até 6 horas em pH 3.0 ou 11.0 as enzimas de *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* mantiveram-se estáveis e conservaram aproximadamente 100% da suas atividades residuais em ambos pHs. Para *H. insolens* a atividade residual quando incubada por até 6 horas em pH 11 também foi mantida 100%, porém em pH 3 atividade residual foi próxima de 50%, isso dá suporte a conclusão que chegamos de que para a característica de estabilidade ao pH *H. insolens* é diferente de *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum* e que os dois últimos são semelhantes entre si.

Estudos com *Penicillium sp.* revelaram que as proteases oriundas deste microrganismo foram bastante estáveis quando incubada em uma faixa ácido para básico , associado a incubação de 24 horas a 4°C. Os resultados mostraram que a enzima advinda de *Penicillium sp.* é muito estável em pHs de 6.0 – 8.0 (Germano *et al.*, 2003).

A protease de *V. fluvialis* mostrou-se estável a uma abrangente faixa de pH, conservando 60% de sua atividade entre os pHs 6.0 á 13.0 (Venugopal & Saramma, 2006).

Proteases estáveis em uma ampla faixa de pH são de extrema importância pois podem ser aplicadas nos mais diferentes processos industriais.

A natural alcalinidade na indústria do leite é de extrema importância um exemplo a ser citado é a protease de *Streptococcus cremoris* usada na indústria do queijo com pH ótimo 8.0, não possui atividade hidrolítica em pH menor que 5.0 , porém em pH 10 possui 50% de sua atividade (Anwar & Saleemuddin, 1998).

Na indústria do couro, proteases são utilizadas como assistentes no passo de depilação, para isso precisam ser estáveis sob condições alcalinas em pH 12.0 (Anwar & Saleemuddin, 1998).

As enzimas estudadas neste trabalho, apresentaram alta estabilidade térmica e uma ampla faixa de estabilidade a pHs, resistindo também a várias horas estáveis em pHs extremos, diante destes resultados continuamos a acreditar que são proteases altamente aplicáveis a uma variedade de processos industriais.

Estudos sobre localização e clivagem proteolítica de uma proteína “espectrin-like” por uma protease denominada de CDP II em *N. crassa* revelaram, que esta proteína é um substrato para CDP II. Experimentos mostraram que CDP II, localizada na região apical da hifa, é uma protease dependente de cálcio e que em presença deste íon a proteólise da proteína “espectrin like” é maior. Os autores sugerem que existe uma relação funcional entre essas duas proteínas e o crescimento da ponta da hifa. A proteólise de “espectrin like” que é uma proteína associada à membrana pode facilitar o acesso de vesículas intracelulares para a membrana plasmática além de permitir sua expansão, tudo isso regulado pela protease dependente de cálcio CDP II (Cotado-Sampayo *et al.*, 2006).

A sinalização por cálcio é um fator importante que implica na regulação do crescimento polarizado e formação de ramos. Em estudos com o fungo aquático *Allomyces*, pesquisadores relataram a presença de duas cálcio dependentes proteases CDP I e CDP II, foi mostrado também que a presença ou a ausência destas enzimas estão relacionadas ao crescimento do fungo (Huber & Ojha, 1994; Ojha & Wallace, 1988; Ojha & Barja, 2003).

Ao comparar resultados obtidos na caracterização das proteases de *Penicillium sp.*, em estudos com íons Ca^{2+} e Na^+ na concentração de 0,1 mM (Germano *et al.*, 2003) e resultados obtidos para *H. grisea var. thermoídea*, quando exposto aos mesmos íons em baixas concentrações, constatamos que para ambos as atividades relativas se mantiveram praticamente iguais, ou seja sem uma influencia significativa dos íons na atividade das proteases.

Em estudos de caracterização da protease do fungo *Clonostachys rosea*, a enzima purificada não necessitou de Ca^{2+} para a sua atividade sendo que Ca^{2+} e Mg^{2+} não afetaram praticamente a atividade proteásica (Li *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram relatados por nós em estudos da atividade proteásica de *H. grisea var. thermoídea*, em que esses mesmos íons independente da concentração utilizada não afetaram a atividade da enzima. Na caracterização de uma nova protease para o poliqueta *Periserrula leucophryna* também verificou-se que a protease produzida pelo organismo não requeria Ca^{2+} para a atividade enzimática (Joo *et al.*, 2001).

Ao compararmos as enzimas dos microrganismos padronizadas neste trabalho, verificamos que as proteases de *H. insolens* e *S. thermophilum* sob a concentração de 1 mM dos efetores CaCl_2 , MgCl_2 , β -mercaptoetanol, NaCl , NH_4Cl_2 e BaCl_2 sofrem ativações significantes. Com o aumento da concentração do efector β -mercaptoetanol de 1 mM para 10 mM, relatamos que as proteases de *H. insolens* e *S. thermophilum* mantiveram suas atividades relativas ativas e constantes. Logo não são afetadas pela concentração deste efector.

Desse modo, verificamos uma maior proximidade quanto às proteases dos fungos *H. insolens* e *S. thermophilum*, fato curioso, uma vez que o esperado era existir uma maior semelhança entre as espécies pertencentes ao gênero *Humicola*. Porém, as proteases de *H. grisea var. thermoídea* não sofreram ativações significantes nem em altas nem em baixas concentrações de CaCl_2 , MgCl_2 , β -mercaptoetanol, NaCl , NH_4Cl_2 e BaCl_2 .

As proteases originárias de *H. grisea var. thermoídea* foram notavelmente distinguidas pelo efeito dos efetores dos demais microrganismos do Complexo *Torula-Humicola* relatados neste trabalho.

Com o aumento da concentração dos íons CaCl_2 , MgCl_2 , NaCl , NH_4Cl_2 e BaCl_2 , de 1mM para 10 mM as proteases de *H. insolens* sofreram uma tímida inibição. Contrário a isso, as proteases de *S. thermophilum* ainda se mantiveram ativas, porém, esta ativação foi menor do que quando submetidas à concentração iônica de 1 mM.

Apesar da maior semelhança quanto a ativação das proteases de *H. insolens* e *S. thermophilum* pelos efetores, as proteases produzidas por ambos são diferentes e distinguíveis entre si e entre *H. grisea var. thermoídea*.

Na caracterização da protease de *Geobacillus sp* YMTC 1049 resultados constataram um aumento da atividade da enzima de 55% e 40% em presença de 10mM de Ca^{2+} e Mg^{2+} , respectivamente (Zhu *et al.*, 2007). Da mesma forma, resultados de ativação em presença de Ca^{2+} e Mg^{2+} , sob esta mesma concentração também foram obtidos e já comentados para as proteases de *S. thermophilum*.

Estudos de termoestabilidade da protease alcalina de *C. coronatus* revelaram que um dos fatores responsáveis pela rápida inativação térmica das proteases é o aumento da proporção da autoproteólise da enzima em elevadas temperaturas. Com isso, os autores sugerem que o Ca^{2+} se liga aos sítios de autólise da enzima sendo responsável pela melhoria da estabilidade térmica da protease de *C. coronatus* (Bhosale *et al.*, 1995). Adicionalmente a isso, Zhu *et al.*, 2007, afirma que geralmente cátions bivalentes como Ca^{2+} e Mg^{2+} afetam a atividade proteásica e a estabilidade para vários graus. Serino-proteases como a subtilisina, possui sítios de ligação de Ca^{2+} , e estes são também funcionam como agentes estabilizadores.

Anwar & Saleemuddin (1998), em sua revisão sobre alcalino proteases afirmam que a maioria dos pesquisadores concordam que Ca^{2+} é o íon mais importante para atividade destas proteases, embora em alguns casos Mn^{2+} e Co^{2+} possam ser necessários como co-fatores.

As proteases aqui estudadas são alcalinas e para os microrganismos *H. insoles* e *S. thermophilum* o íon Ca^{2+} tem uma grande importância na ativação enzimática.

Um resultado importante na caracterização de uma alcalina serino-protease produzida por um isolado *A. clavatus* ES1 foram semelhantes aos resultados de efeitos do íon CaCl_2 obtidos para *H. insolens* e *S. thermophilum*. Para a protease de *A. clavatus* ES1 em concentrações de 5 mM os íons CaCl_2 e MgSO_4 aumentaram a atividade proteásica para 124% e 108%. A enzima foi ligeiramente inibida pelo

agente quelante EDTA (5 mM), com 8% da atividade original sendo perdida indicando a importância de Ca^{2+} na sua estabilização (Hajji *et al.*, 2007).

Essas descobertas seguem vários relatos recentes sobre atividade estrutural de serino proteases dependentes de Ca^{2+} e sua remoção, que acarreta uma significativa redução da estabilidade térmica (Hajji *et al.*, 2007). As proteases de *H. insolens* e *S. thermophilum* quando submetidas ao EDTA em baixas concentrações diminuíram em 52% para ambos suas atividades relativas, e em altas concentrações essa diminuição foi de 50% para os dois microrganismos. Para o *H. grisea var. thermoidea* o efeito do EDTA sob a atividade proteolítica relativa em altas e baixas concentrações foi de uma perda da atividade relativa de apenas 10%, um valor que consideramos insignificante para considerar uma inibição.

É provável que as enzimas de *S. thermophilum* e *H. insolens* possuam sítios de ligações para o cálcio devido à alta inibição da atividade relativa em presença de EDTA e a alta ativação pelo íon cálcio, porém estudos complementares são necessários para uma afirmação definitiva. Sendo importante lembrar que estas enzimas mostraram uma ativação da atividade relativa para outros íons e essa ativação não pode ser desconsiderada.

Em processos de formulação de detergentes, em que alcalino proteases são comumente adicionadas agentes quelantes são também incluídos para superar o problema de dureza da água, que está relacionado com a concentração de íons de determinados minerais dissolvidos nesta substância. A dureza da água é predominantemente causada pela presença de sais de cálcio e magnésio.

Em presença de agentes quelantes, o cálcio ligado a protease alcalina pode ser removido, diminuindo a estabilidade térmica e afetando a aplicação da enzima na indústria de detergentes (Genckal & Tari, 2006).

A estabilidade das enzimas em presença de EDTA é vantajosa para seu uso com aditivos em detergente (Genckal & Tari, 2006). As enzimas produzidas por *H. grisea var. thermoidea* não são afetada de forma significativa pelo íon Ca^{2+} bem como pelo EDTA, assim sugerimos que as proteases produzidas por este

microrganismo até o presente momento podem ser aplicadas a indústria de detergentes.

Ao submeter às proteases oriundas de *H. insolens* e *H. grisea var. thermoídea* a concentrações de 1mM dos íons CoCl_2 , HgCl_2 , AlCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 constatamos significativa inibição de ambas atividades relativas proteásicas. Outra diferença entre as proteases dos dois organismos está na inibição pelo íon CuSO_4 na concentração de 1 mM encontrada nas proteases oriundas de *H. grisea var. thermoídea* e não observada nas excretadas por *H. insolens*.

As proteases de *S. thermophilum* são semelhantes as de *H. insolens* e *H. grisea var thermoídea* por também sofrerem inibições pelos íons CoCl_2 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 na concentração de 1mM, porém são também diferenciadas de ambos os fungos por não sofrerem inibições em baixas concentrações iônicas por AlCl_3 e íon CuSO_4 .

Em estudos com *V. fluvialis* foi relatado a ativação proteásica para 112% (1 mM) quando a enzima desta bactéria foi submetida ao íon Fe^{2+} , esse resultado é contrário aos nossos uma vez que o íon Fe^{2+} inibiu totalmente as proteases dos três microrganismos aqui estudados sob a mesma concentração (Venugopal & Saramma, 2006).

Baixas concentrações de Hg^{2+} , inibiram fortemente a atividade proteásica das enzimas de *H. insolens* e *H. grisea var. thermoídea*. As proteases descritas a partir do poliqueta *P. leucophryma* assim como para *S. thermophilum* não foram afetadas quando expostas a baixas concentrações de Hg^{2+} (Joo *et al.*, 2001).

Em testes com íons sob a concentração de 10 mM constatamos inibições por CoCl_2 , MnCl_2 e CuSO_4 comuns para os três fungos. A protease de *H. insolens* diferenciou-se das demais por sofrer uma leve inibição pelos íon BaCl_2 e NH_4Cl_2 nesta mesma concentração.

Altas concentrações dos íons (10 mM) HgCl_2 , AlCl_3 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ e ZnCl_2 inibiram totalmente as proteases dos fungos aqui caracterizadas, isso retrata uma semelhança entre estas enzimas.

Em estudos com proteases produzidas *D. shizishanna* uma severa inativação em 88% da atividade enzimática ocorreu quando esta foi exposta a Cu^{2+} , esses resultados foram semelhantes aos nossos, quando as enzimas foram submetidas a altas concentrações de Cu^{2+} .

Em baixas ou altas concentrações Zn^{2+} causou inibição das enzimas aqui estudadas, para *D. shizishanna* uma inibição amena em 28% da atividade relativa foi observada quando sua enzima foi exposta ao mesmo íon. Já para o íon Fe^{2+} as enzimas de *D. shizishanna* foram inibidas em 58%, para os fungos relatados por nós este íon em baixas ou altas concentrações inibiu totalmente nossas proteases (Wang *et al.*, 2006).

Na literatura estudos sobre inibição da atividade proteásica de *Geobacillus sp.* YMTC 1049 revelaram que Na^+ e K^+ (10mM) não afetaram a atividade proteásica porém assim como resultados obtidos neste trabalho os íons ZnCl_2 , MnCl_2 e CoCl_2 (10 mM) afetaram fortemente a atividade da protease de *Geobacillus* em: 78%, 60% e 59% nesta ordem.

O íon Cu^{2+} para as proteases dos fungos do Complexo Torula-Humicola aqui discutidos inibiu fortemente a atividade relativa proteolítica, contrário a isso, uma leve inibição em apenas 11% da atividade relativa proteásica foi observada na protease originária de *Geobacillus sp* (Zhu *et al.*, 2007).

Sob a influência dos íons Ba^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} (5 mM) a protease obtida de *A. clavatus* ES1 foi inibida em 77%, 62% e 16%, respectivamente. Já quando exposta a Co^{2+} a inibição foi completa (Hajji *et al.*, 2007).

Na mistura de efetores para *H. insolens* ao adicionarmos Ca^{2+} e Mg^{2+} observamos que juntos os íons estimulam (15%) ligeiramente a atividade proteolítica, sugerindo que podem se ligar no mesmo sitio. Entretanto, não podemos esquecer que temos uma mistura de 3 enzimas proteolíticas no filtrado do *H. insolens*. Tal fato pode levar a uma associação de resultados que não permita um prognóstico correto da ação do cálcio e do magnésio nas proteases. A ativação por β -mercaptoetanol (88%) sugere que grupos sulfidrílicos reduzidos são importantes

para a atividade proteolítica. Os experimento com EDTA confirmam que a enzima ou enzimas são moduladas por cálcio ou magnésio.

Para as enzimas advindas de *H. grisea var. thermoídea* não foram observadas grandes ativações para as misturas de efetores Quando adicionamos Ca^{2+} e Mg^{2+} verificamos uma ativação de aproximadamente 23%, valores de ativação bastante próximos foram também observados nas misturas de: Ca^{2+} e β -mercaptoetanol, Mg^{2+} e β -mercaptoetanol. A maior ativação constatada foi na mistura de $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \beta$ -mercaptoetanol que chegou a 30%, porém todas essas ativações foram consideradas leves comparadas as dos outros microrganismos.

As proteases de *S. thermophilum*, quando tratadas com cálcio e ou magnésio se comportam como as de *H. insolens*, sugerindo com mais evidência de que os dois íons agem num mesmo sitio, uma vez que a mistura deles na reação promovem uma ativação que é intermediária aos valores esperados, caso fossem sítios separados.

Na análise dos zimogramas verificamos o número de proteases produzidas entre as linhagens. Após o desenvolvimento dos géis e incubação constatamos a diferença entre o número de proteases produzidas pelos microrganismos. *H. insolens* produziu três proteases, essas foram encontradas próximas as frações 5, 12 e 28 do gel.

Verificamos que *H. grisea var. thermoídea* produziu quatro proteases uma inicial também encontrada em *S. thermophilum* e outras nas frações, 12, 25 e 28. A protease próxima a fração 25 diferencia este microrganismo dos demais, pois ela é única dentre as linhagens.

O zimograma das proteases advindas de *S. thermophilum* revelou a existência de três enzimas. Este microrganismo produz uma protease localizada próxima a fração 32 que o diferencia dos demais organismos assim como a ausência da produção da protease próxima a fração 28.

Os resultados aqui apresentados desde a padronização até os estudos dos zimogramas dos microrganismos *H. insoles*, *H. grisea var. thermoídea* e *S.*

thermophilum mostraram marcantes diferenças entre os fungos. Sugerimos com base nestes dados, que os microrganismos são organismos distintos, porém estudos de purificação e seqüenciamento já estão sendo iniciados apenas para fundamentar ainda mais essa sugestão outrora levantada por nós.

Aspectos sob a regulação e fisiologia das proteases para esses microrganismos, agora um pouco mais entendidas mostram que estas enzimas podem estar relacionadas com o crescimento e desenvolvimento do microrganismo.

Resultados de estabilidade térmica e estabilidade ao pH nos permitem dizer que estas enzimas podem ser aplicadas industrialmente.

O fato da atividade proteolítica produzida por *H. grisea var. thermoídea* não ser inibida pelo efetor EDTA nos faz acreditar que ela é uma enzima com grande potencial para a aplicação na indústria de detergentes, uma vez que em processos de formulação de detergentes, proteases alcalinas são comumente adicionadas, agentes quelantes são também incluídos para superar o problema da água dura. Dessa forma as enzimas não afetadas por agentes quelantes tais como as originadas de *H. grisea var. thermoídea* não sofreriam influência deste efetor em processos industriais aplicados a indústria de detergentes.

Como conclusão podemos afirmar que este estudo foi muito importante para apontar diferenças existentes entre as proteases das linhagens dos fungos *H. insolens*, *H. grisea var. thermoídea* e *S. thermophilum*. Além disso, contribuiu para o início do entendimento sobre aspectos de regulação das proteases produzidas por estes microrganismos, assim como determinou o quão promissor é o potencial biotecnológico dos fungos, que além de excelentes produtores de proteases, são capazes de produzir estas enzimas a partir do resíduo agro-industrial bagaço de cana.

6. Referências Bibliográficas

- Amoozegar, M. A., Fatemi, A. Z., Heidari, H. R. K., Razavi, M. R.** 2007. Production of a extracellular alkaline metalloprotease from newly isolated, moderately halophile, *Saliniovibrio sp.* Strain AF-2004. Microbiological Research. **162**:369-377.
- Anwar, A., and Saleemuddin, M.** 1998. Alkaline Proteases: A Rewiew. Bioresource Technology. **64**:175-183.
- Aquino, A. C. M. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M.** 2001. Thermostable glucose-tolerant glucoamylase produced by thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Folia Microbiologica. **45(6)**:11-16.
- Aquino, A. C. M. M., Jorge, J. A., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M.** 2003. Studies on a thermostable α -amylase from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. Applied Microbiology & Biotechnology. **61(4)**:323-328.
- Bhosale, S. H., Rao, M. B., Deshpande, V. V., Srinivasan, M. C.** 1995. Thermostability of high-activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). Enzyme and Microbial Technology. **17**:136-139.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. **72**:248-254.
- Brock, F. M., Forsberg, C. W., Jock, G., Smith, B.** 1982. Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. Applied and Environmental Microbiology. **44(3)**:561-569.

- Cardello, L., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.** 1994. A cytosolic trehalase from the thermophilic fungus *Humicola grisea var. thermoidea*. *Microbiology (UK)*. **140**:1671-1677.
- Carrea, G., and Colombo, G.** 2000. Coupling high enzyme activity and stability: a challenging target. *Forum*. **18**:401-402.
- Cereia, M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., Greene, L. J., ROSA, J. C., Polizeli, M. L. T. M.** 2000. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* biochemical and regulatory properties. *Journal of Basic Microbiology*. **2**:83-92.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E., Lumyong, S.** 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*. **28**:241-245.
- Cohen, B. L.** 1973. Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology*. **79(2)**:311-320.
- Cooney, D. G. and Emerson, R.** 1964. Thermophilic fungi: an account of their biology, activities and classification. San Francisco – W.H. Freeman.
- Cotado-Sampayo, M., Ojha, M., Pérez, O., Chappuis, M. –L., Barja, F.** 2006. Proteolytic cleavage of a spectrin-like protein by calcium-dependent protease in *Neurospora crassa*. *Current Microbiology*. **53**:311-316.
- Davis, B. J.** 1964. Disc electrophoresis. II. Methods and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **121**:404-427.

- Donaghy, J. A. and McKay, A. M.** 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aerobasidium pullulans*. *Journal of Applied Bacteriology*. **74**:662-666.
- Genckal, H., and Tari. C.** 2006. Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus sp* isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology*. **39**:703-710.
- Gerald, A., Rufo, JR., Sullivan, B. J., Sloma, A., Pero, J.** 1990. Isolation and characterization of a novel extracellular metalloprotease from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **172(2)**:1019-1023.
- Germano, S., Pandey, A., Osaku, C.A., Rocha, S.N., Soccol, C.R.** 2003. Characterization and stability of proteases from *Penicillium sp*. Produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **32**:246-251.
- Gomes, E., Guez, M. A. U., Martin, N., Silva, R. D.** 2007. Enzimas termoestáveis: Fontes, Produção e Aplicação Industrial. *Química Nova*. **30(1)**:136-145.
- Gomes, J., and Steiner, W.** 2004. The biocatalytic potential of extremophile and extremozymes. *Food Technology Biotechnology*. **42**:223-235.
- Guimarães, L. H., Terenzi, H. F., Polizeli, M. L. T. M.** 2001. Thermostable conidial and micelial alkaline phosphatases from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. **27**:265-270.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P.** 2002. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*. **59**:15-32.

- Hajji, M., Kanoun, S., Nasri, M., Gharsallah, N.** 2007. Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. *Process Biochemistry*. **42**:791-797.
- Hanson, M. A. and Marzuf, G. A.** 1975. Control of the synthesis of a single by a multiple regulatory circuit in *Neurospora crassa*. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*. **72**:1240-1244.
- Hashimoto, H., Iwaasa, T., Yokotsuna, T.** 1973. Some properties of acid proteases from the thermophilic fungus *Penicillium duponti* K1014. *Applied Microbiology*. **25**:578-583.
- Huber, D., and Ojha, M.** 1994. Immunocytochemical localization of Ca²⁺ dependent protease in *Allomyces arbuscula*. *Febs Letters*. **341**:268-272.
- Ifrij, I., and Ögel, Z. B.** 2002. Production of neutral and alkaline extracellular proteases by the thermophilic fungus, *Scytalidium thermophilum*, grown on microcrystalline cellulose. *Biotechnology Letters*. **24**:1107-1110.
- James, M. N. G.** 2006. The peptidases from fungi and viruses. *Journal of Biological Chemistry*. **387**:1023-1029.
- Joo, H. A., Park, G. C., Kim, K. T., Paik, S. R., Chang, C. S.** 2001. Simple methods for alkaline protease purification from the polychaeta, *Periserrula leucophryna*. *Process Biochemistry*. **37**:299-303.
- Kadowaki, M. K., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.** 1996. Characterization of trehalase activities from thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum*. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1291**:199-205
- Kumar, C. G., and Takagi, H.** 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. **17**:561-594.

- Li, J., Yang, J., Huang, X., Zhang K. Q.** 2006. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. *Process Biochemistry*. **41**:925-929.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J.** 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*.**193**:265-275.
- Maheshwari, R., Bharadwaj, G., Bhat, M. K.** 2000. Thermophilic fungi: Their physiology and enzyme. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **64(3)**:461-488.
- Mehta, U. J., Thumar, J. T., Singh, S.P.** 2006. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycetes. *Bioresource technology*. **97**:1650-1654.
- Merheb, C. W., Cabral, H., Gomes, E., Da-Silva, R.** 2006. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*. **104**:127-131.
- Miller, G. L.** 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. **31**:426-428.
- Nelson, D. L., and Cox, M. M.** 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. New York: Worth Publishers. 3ed. Capitulo 5, p. 115.

- Ojha, M., and Barja, F.** 2003. Spatial and cellular localization of calcium-dependent protease (CDP II) in *Allomyces arbuscula*. *Journal of Cell Science*. **116(6)**:1095-1105.
- Ojha, M., and Wallace, C. J. A.** 1988. Novel calcium-activated neutral protease from aquatic fungus *Allomyces arbuscula*. *Journal of Bacteriology*. **170(3)**:1254-1260.
- Rao, Ch. S., Sathish, T., Ravichandra, P., Prakasham, R. S.** 2009. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. *Process Biochemistry*. **44**:262-268.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., Deshpande, V. V.** 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **62 (3)**:597-635.
- Rawlings, N. D., and Barrett, A. J.** 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. **290**:205-218.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P., Barrett, A. J.** 2004. MEROPS: the peptidases database. *Nucleic Acids Research*. **32**:D160-D140.
- Rodrigues, E. C., Pizzirani-Kliner, A. A., Tanaka, Y., Jorge, J. A.** 1991. Cytogenetic and biochemical aspects of the cellulolytic fungus *Humicola sp.* *Mycological Research*. **95**:168-177.
- Said, S., and Pietro, R.C.L.** 2002. Enzimas de interesse industrial e biotecnológico. Ribeirão Preto: Eventos. 1ed. Capítulo 5, p. 53-77.
- Said, S., and Pietro, R.C.L.** 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa. 1ed. Capítulo 18, p. 326-347.

- Savtchenko, E. S., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.** 1986. Alkaline protease deficiency in the cr-1 (CRISP) mutant of *Neurospora crassa*. Brazilian Journal of Medical Biological Research. **19**:27-32.
- Straatsma, G., and Samson, R. A.** 1993. Taxonomy of *Scytalidium thermophilum*, an important thermophilic fungus in mushroom compost. Mycological Research. **97(3)**:321-328.
- Valasaki, K., Staikou, A., Theodorou, L. G., Charamopoulou, V., Zacharaki, P., Papamichael, E. M.** 2008. Purification and kinetics of two novel thermophilic extracellular proteases from *Lactobacillus helveticus*, from kefir with possible biotechnological interest. Bioresource Technology. **99**:5804-5813.
- Venugopal, M., and Saramma, A.V.** 2006. Characterization of alkaline protease from *Vibrio fluvialis* strain VM10 isolated from mangrove sediment sample and its application as a laundry detergent additive. Process Biochemistry. **41**:1239-1243.
- Vishwanatha, K. S., Rao, A. G. A., Singh, S. A.** 2009. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Food Chemistry. **114**:402-407.
- Wang, B., Wu, W., Liu, X.** 2007. Purification and characterization of a neutral serine protease with nematicidal activity from *Hirsutella rhossiliensis*. Mycophatologia. **163**:169-176.
- Wang, H. T., and Hsu, J.T.** 2005. Optimal protease production condition for *Prevotella ruminicola* 23 and characterization of its extracellular crude protease. Anaerobe. **11**:155-162.
- Wang, R. B., Yang, J. K., Lin, C., Zhang, Y., Zhang, K. Q.** 2006. Purification and characterization of a extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishanna*. Letters in Applied Microbiology. **42**:589-594.

- Wang, S. L., Chen, Y. H., Wang, C. L., Yen, Y. H., Chern, M. K.** 2005. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*. **36**:660-665.
- Zanoelo, F. F., Polizeli, M. L. T. M., Terenzi, H. F., Jorge, J. A.** 2004. B – Glucosidase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* is stimulated by glucose and xylose. *Fems Letters Microbiology*. **240**:137-143.
- Zhu, W., Cha, D., Cheng, G., Peng, Q., Shen, P.** 2007. Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049. *Enzyme and Microbial Technology*. **40**:1592-1597.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)