

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTIDASES SECRETADAS PELA BACTÉRIA HALOFÍLICA *Halobacillus blutaparonensis*

Anderson Fragoso Dos Santos



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Orientadores: André Luis Souza dos Santos
Lucy Seldin

RIO DE JANEIRO
JULHO DE 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PEPTIDASES SECRETADAS PELA
BACTÉRIA HALOFÍLICA *HALOBACILLUS BLUTAPARONENSIS***

Anderson Fragoso Dos Santos

Orientadores: André Luis Souza dos Santos

Lucy Seldin

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Aprovado por:

(André Luis Souza dos Santos, Prof. Dr. IMPPG, UFRJ)

(Lucy Seldin, Prof^a. Dr^a. IMPPG, UFRJ)

(Rosalie Reed Coelho, Prof^a. Dr^a. IMPPG, UFRJ)

(Raquel Silva Peixoto, Prof^a. Dr^a. IMPPG, UFRJ)

(Fábio Vieira de Araujo, Prof. Dr. UERJ-FFP)

(Cláudia Mansini d'Ávila-Levy, Prof^a. Dr^a. FIOCRUZ)

(Marta Helena Branquinho, Prof^a. Dr^a. IMPPG, UFRJ)

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Anderson Fragoso

Identificação e caracterização de peptidases secretadas pela bactéria halofílica *Halobacillus blutaparonensis*/Anderson Fragoso dos Santos – Rio de Janeiro, UFRJ/IMPPG, 2010

X,75f.; 31cm

Orientadores: André Luis Souza dos Santos e Lucy Seldin

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)

Universidade Federal do Rio de Janeiro / Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2010.

Referências bibliográficas: 49-57

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. Peptidases | 2. <i>Halobacillus blutaparonensis</i> |
| 3. halotolerante/halofílica | 4. Serina peptidase |
| 5. Restinga de Jurubatiba | |

I. Santos, André Luis Souza dos Santos e Seldin, Lucy II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia). III. Identificação e caracterização de peptidases secretadas pela bactéria halofílica *Halobacillus blutaparonensis*.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Estudos Integrados em Bioquímica Microbiana e no Laboratório de Genética Microbiana, Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes (IMPPG), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), sob a orientação do Prof. André Luis Souza dos Santos e da Profa. Lucy Seldin.

**“Loucos abrem caminhos que mais
tarde serão percorridos pelos sábios.”**

(Carlo Dossi, pensador Italiano)

AGRADECIMENTOS

A Deus por me ensinar que tudo na vida é passageiro, tanto os momentos difíceis como os momentos de felicidades.

Ao meu orientador e amigo André Santos, pelo imenso empenho a este trabalho, pelo exemplo de dedicação e amor a profissão, por demonstrar que quando se gosta do que faz a rotina torna-se algo divertido, por confiar e sempre estimular qualquer idéia sugerida. É um prazer e orgulho ser seu aluno. Muito obrigado por tudo!

A minha co-orientadora Lucy Seldin, por possibilitar a realização deste trabalho, que mesmo tendo convivido por pouco tempo aprendi muito, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação a ciência.

A Marta Branquinho pela grande colaboração na revisão desta dissertação.

A Roberta Valle por me ajudar em inúmeros experimentos realizados neste trabalho e em especial pela amizade.

A Poli, Carina, Érica, Lívia, Lys, Diego, Ana Carolina, e em especial a Ana Luiza, por sempre estarem à disposição para ajudar no que for preciso

A todas outras meninas do Laboratório, Bianca, Priscila, Fenanda, Débora, Mariana, Juliana, Luna, Gabriele, Jéssica, por tornar o dia sempre muito festivo.

A Geralda, que devido ao seu trabalho facilita a vida de todos no laboratório.

Ao Márcio e Léo, que talvez sem perceberem influenciaram na minha formação, pelo exemplo de alegria e dedicação a pesquisa.

A Vanessa Marquez pela imensa colaboração no desenvolvimento inicial deste trabalho.

A todos do Laboratório de Genética Microbiana, e em especial a Vanessa Marquez pela imensa colaboração no desenvolvimento inicial deste trabalho e pela amizade.

A minha namorada Cynthia pela paciência e ajuda na revisão das referências.

A CNPQ pela bolsa concedida

Aos meus pais, Osvaldo e Fátima, muito obrigado por tornar todo este momento possível. Agradeço ao imenso amor e dedicação para minha formação pessoal e profissional. Vejo vocês como exemplo de vida e união.

Aos meus irmãos Henrique e Lucas e amigo Rafael pelo companheirismo e amizade. Meus sinceros agradecimentos por em inúmeras oportunidades abrirem mão de diversas coisas para me apoiarem na realização deste trabalho.

Ao meu avô Osvaldo que agora está permanentemente presente ao meu lado.

Aos meus avós, Marina, Frago e Luiza. Agradeço pelo amor e pelo carinho.

A minha tia Ângela Márcia, por toda a colaboração na correção desta tese e pelo imenso carinho.

RESUMO

Identificação e caracterização de peptidases secretadas pela bactéria halofílica
Halobacillus blutaparonensis

Anderson Fragoso dos Santos

Orientadores: André Luis Souza dos Santos e Lucy Seldin

Peptidases são produzidas por vários microrganismos, algumas das quais aplicadas em processos biotecnológicos. A impossibilidade na obtenção, em grande escala, de peptidases de plantas e animais para atender à demanda mundial de enzimas têm levado a um interesse cada vez maior pelas peptidases de origem microbiana. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar peptidases secretadas pela estirpe M9 de uma nova espécie bacteriana designada *Halobacillus blutaparonensis*, que apresenta as seguintes características: Gram-positiva, halofílica moderada e formadora de esporos. Essa bactéria foi isolada da raiz de *Blutaparon portulacoides*, que é uma erva perene e rizomatoza de região costeira, encontrada na faixa de areia paralela à linha da praia na Restinga de Jurubatiba – região norte do Estado do Rio de Janeiro. Os estudos de cinética de crescimento celular de *H. blutaparonensis* demonstraram crescimento em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de NaCl (variando de 0,5 a 10%), com máximo de produção de células a 2,5% de NaCl. Nessa nova espécie bacteriana foram identificadas, através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) contendo gelatina como substrato incorporado ao gel, três peptidases secretadas com massas moleculares de aproximadamente 45, 35 e 28 kDa. Estas peptidases apresentaram as seguintes propriedades bioquímicas: (i) atividades em amplo espectro de pH (2,0 a 9,0 – tendo o máximo das atividades hidrolíticas em pH neutro), (ii) atividades em diferentes concentrações de sal (0,5% a 20% de NaCl), (iii) inibição das peptidases de 45 e 28 kDa por PMSF (um inibidor de serina peptidases) e da peptidase de 35 kDa por 1,10-fenantrolina (um inibidor de metalopeptidase), (iv) degradação de diferentes substratos protéicos (gelatina, caseína, albumina), (v) a peptidase majoritária (45 kDa) foi a única que degradou hemoglobina, tendo sua atividade proteolítica totalmente inibida pelos íons Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} e parcialmente inibida por íons Co^{2+} na concentração de 10 mM. A serina peptidase majoritária de 45 kDa demonstrou ainda termoestabilidade moderada e uma ótima estabilidade a uma ampla faixa de pH (5 a 9). A maneira como essas enzimas proteolíticas podem responder a esse leque de condições ambientais, sem perder a atividade hidrolítica, é o próximo passo na busca de “super-enzimas” para práticas industriais, já que muitas dessas práticas não utilizam somente condições extremas de salinidade, temperatura ou pH, mas sim procedimentos com ampla variações destas condições. A forma como esses microrganismos se adaptam a variações de salinidade e o conhecimento de como essas enzimas suportam ambientes variados são fundamentais para muitas áreas da biotecnologia.

Palavras chaves: peptidases, *Halobacillus blutaparonensis*, halofílica moderada, serina peptidase, restinga de Jurubatiba.

Rio de Janeiro

Julho, 2010

ABSTRACT

Identification and characterization of peptidases secreted by the halophilic bacterium
Halobacillus blutaparonensis

Anderson Fragoso dos Santos

Advisors: André Luis Souza dos Santos and Lucy Seldin

Peptidases are produced by several microorganisms, some of them with applicability on biotechnological processes. The impossibility in obtaining peptidases from plants and animals in large scale in order to support the world demand for enzymes has led to an increasing interest in peptidases of microbial origin. The present study aimed to identify and characterize secreted peptidases by the strain M9 from a new species of bacterium named *Halobacillus blutaparonensis*, which presents the following characteristics: Gram-positive, moderate halophilic and spore-forming bacterium. This strain was isolated from the roots of *Blutaparon portulacoides*, a coastal perennial rhizomatous herb found on the sand strip parallel to the Restinga of Jurubatiba – north of Rio de Janeiro State. The growth kinetic studies of *H. blutaparonensis* showed that this species is able to grow in culture medium supplemented with different concentrations of NaCl (ranging from 0.5 to 10%), with highest cellular growth at 2.5% NaCl. By means of sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) containing gelatin as the copolymerized proteinaceous substrate, three secreted peptidases with molecular masses of 45, 35 and 28 kDa were identified in this new bacterium species. These peptidases presented the following biochemical properties: (i) hydrolytic activities in a wide pH range (from 2.0 to 9.0, presenting the highest activities at neutral pH), (ii) activities in different salt concentrations (0.5% to 20% NaCl), (iii) the peptidases of 45 and 28 kDa were fully inhibited by PMSF (a serine peptidase inhibitor), while 1,10-phenanthroline (a metallopeptidase inhibitor) blocked the 35 kDa peptidase activity, (iv) cleavage of different protein substrates (gelatin, casein and albumin), (v) the major peptidase (45 kDa) also degraded hemoglobin, being its activity totally inhibited by divalent ions at 10 mM like Cu^{2+} , Zn^{2+} and Fe^{2+} and partially inhibited by Co^{2+} . The major 45 kDa serine peptidase demonstrated moderate thermostability and excellent stability to a wide range of pH conditions (5 to 9). The way these enzymes may respond to that range of environmental conditions, without losing their optimal hydrolytic activities, is the next step in the search for “super enzymes” in order to apply in industrial practices, since many of these practices do not use only extreme salinity, temperature or pH conditions, but processes that require a wide variation in these physicochemical conditions. The mechanisms used by these microorganisms to adapt to the salinity variations and the knowledge on how these enzymes tolerate these distinct environments are essential questions in many areas of biotechnology.

Key words: peptidases, *Halobacillus blutaparonensis*, moderate halophilic bacterium, serine peptidase, restinga of Jurubatiba.

Rio de Janeiro
July, 2010

LISTA DE ABREVIATURAS

- AIDS (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*): Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AGPACL Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa
- BSA Soro Albumina Bovina
- DNA (*deoxyribonucleic acid*) ácido desoxirribonucleico
- EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid*): Ácido etilenodiamino tetracético
- KDa kilodaltons
- LB Meio Luria-Bertani
- NaCl: Cloreto de sódio
- PARNA Parque Nacional
- SDS dodecil sulfato de sódio
- SDS-PAGE eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
- TLCK N-p-tosil-L-lisina-clorometil cetona
- UFC unidades formadoras de colônia
- UNESCO United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
- INPE Instituto Nacional De Pesquisas Espaciais
- UA unidade arbitrária

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
1 ENZIMAS	4
2 ENZIMAS PROTEOLÍTICAS.....	5
2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS PEPTIDASES.....	6
2.2 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE DETERGENTE.....	8
2.3 PEPTIDASES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS	9
2.4 PEPTIDASES EM QUÍMICA FINA	10
2.5 INIBIDORES DE PEPTIDASES NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA	11
3 ENZIMAS EM MICRORGANISMOS	12
4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR EXTREMÓFILOS	12
5 ADAPTAÇÃO A AMBIENTES SALINOS: HALÓFILOS.....	14
6 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DOS MICRORGANISMOS HALOTOLERANTES E HALOFÍLICOS	17
6.1 ENZIMAS PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS HALOFÍLICAS E HALOTOLERANTES	17
6.1.1 HIDROLASE	17
6.1.2 β -GALACTOSIDASE.....	17
6.1.3 AGARASE.....	18
6.1.4 AMILASE	18
6.1.5 ISOMERASE.....	19
6.1.6 SERINA PROTEASE	19
6.2 SUPLEMENTOS E CORANTES ALIMENTARES	19
7 RESTINGA: AMBIENTE COM POTENCIAL DE ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS HALOFÍLICOS E HALOTOLERANTES	20
7.1 RESTINGA DE JURUBATIBA.....	21
JUSTIFICATIVA.....	25
PROPOSIÇÃO	26
1 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS PELA ESTIRPE M9 DE <i>Halobacillus blutaparonensis</i>	26

2	SELEÇÃO DE ESTIRPES QUE APRESENTEM ATIVIDADE PROTEOLÍTICA ENTRE DIFERENTES ISOLADOS BACTERIANOS DA RAIZ E DA RIZOSFERA DE <i>BLUTAPARON PORTULACOIDES</i> E TAMBÉM DE SOLO NÃO-RIZOSFÉRICO DA RESERVA DE JURUBATIBA.....	27
MATERIAIS E MÉTODOS		27
1	MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	27
2	CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO.....	27
3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS CELULARES E EXTRACELULARES....	27
4	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS	28
5	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM GEL DE SDS-PAGE.....	28
6	DOSAGEM QUÍMICA PROTEOLÍTICA.....	28
7	CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DAS PROTEASES	29
7.1	QUANTO AO PH ÓTIMO	29
7.2	QUANTO AO GRUPAMENTO QUÍMICO PRESENTE NO SÍTIO ATIVO	29
7.3	QUANTO À SENSIBILIDADE A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE NACL	29
7.4	QUANTO À TEMPERATURA.....	30
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

INTRODUÇÃO

Compatibilizar o desenvolvimento econômico com a proteção ambiental, mediante o uso racional dos recursos naturais, a preservação e a recuperação do meio ambiente e o controle da poluição parece ser o objetivo central das novas abordagens industriais e econômicas. Este conjunto de medidas possibilitará um desenvolvimento sustentável, dependente, porém, de planejamento e do reconhecimento de que os recursos naturais são finitos (AHUJA, FERREIRA & MOREIRA 2004).

Em muitos casos, o desenvolvimento é confundido com crescimento econômico, que depende do consumo crescente de energia e recursos naturais. Esse tipo de desenvolvimento tende a ser insustentável, pois leva ao esgotamento dos recursos naturais dos quais a humanidade depende. Atividades econômicas podem ser encorajadas em detrimento da base de recursos naturais dos países. Desses recursos dependem não só a existência humana e a diversidade biológica, mas também o próprio crescimento econômico (AHUJA, FERREIRA & MOREIRA 2004).

Neste contexto, a “bioeconomia”, que é uma economia ecológica e socialmente sustentável, apresenta-se como uma solução economicamente viável (GEORGESCU-ROEGEN,1977). A utilização da bioeconomia pretende diminuir os custos e a produção, substituindo produtos sintéticos por produtos biodegradáveis e renováveis.

Muitas indústrias que compartilham dessa filosofia econômica utilizam como ferramenta a biocatálise, que consiste num processo pelo qual um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato em um produto final. Isso se dá através de um número limitado de etapas enzimáticas, o que promove a redução dos impactos ambientais negativos sem comprometer a competitividade das empresas. No entanto, o desenvolvimento e a aplicação de novas tecnologias enzimáticas necessitam de adequada discussão dos seus efeitos, abrangência e aplicabilidade sob o ponto de vista nacional e internacional (AEHLE, 2004). Para que a biocatálise seja considerada uma ferramenta de rotina em processos economicamente sustentáveis e apresente vantagens competitivas, devem ser preenchidas condições básicas relacionadas à disponibilidade das enzimas, à previsibilidade do seu desempenho e seu custo (LIESE, SEELBACH & WANDREY 2006).

1 – Enzimas

Em todas as células vivas ocorrem ininterruptamente reações que, devido a sua grande complexidade, deveriam ser muito lentas nas temperaturas em que essas reações se processam (ao redor de 37°C). No entanto, essas reações são muito rápidas, o que nos leva à conclusão de que existem nas células vivas substâncias catalisadoras que diferem dos catalisadores inorgânicos pelo fato de serem substâncias muito mais complexas, formadas no interior das células vivas, mas capazes de agir também fora das células (PRICE & STEVENS, 1989). As enzimas são catalisadores biológicos presentes em todos os seres vivos. Elas são largamente utilizadas, com aplicação em diversos campos, incluindo biorremediação, síntese orgânica, análises clínicas, produção de fármacos, detergentes, alimentos, fermentação, dentre outros (LIESE, SEELBACH & WANDREY 2006). Parte das proteínas sintetizadas nas células são enzimas citoplasmáticas, referidas como *enzimas intracelulares*, que somente podem ser obtidas e avaliadas pelo rompimento da célula. Mas esta também tem a capacidade de sintetizar enzimas que são liberadas para fora da célula, podendo ser encontradas no meio de cultivo, sendo assim mais facilmente isoladas e avaliadas, denominadas de *enzimas extracelulares* (PRICE & STEVENS, 1989).

Como o mecanismo celular dos sistemas vivos, animais, vegetais e microrganismos, depende das enzimas, a fonte primária destas são os tecidos animais (glândulas, principalmente), tecidos vegetais (sementes, frutas e exsudações) e cultura de microrganismos, quer se fazendo uso de cultivo total, quer extraíndo as enzimas do meio de cultura de bactérias e/ou fungos (REGULY, 2000).

Como fonte de enzimas, os vegetais têm duas limitações devido ao fato de que relativamente pouca enzima pode ser extraída de uma grande massa vegetal, o que torna o processo economicamente viável apenas onde a mão de obra e a terra tiverem custo menor. São poucas as enzimas que podem ser obtidas economicamente nestas condições. Enzimas de glândulas e órgãos de animais também têm produção limitada, porque são obtidas de subprodutos da industrialização de carnes, recurso alimentar nobre e, por isso, além de dispendiosos, de oferta geralmente escassa (REGULY, 2000).

Já enzimas microbianas, produzidas através do cultivo de microrganismos em substratos apropriados, não sofrem as limitações descritas. Havendo disponibilidade de meio de cultura, sendo disponível e conhecido o microrganismo mais apropriado e o

método e as condições de cultivo, a produção é potencialmente ilimitada, dependendo da economia do respectivo processo (MILLER JR & NAGARAJAN, 2000)

2 – Enzimas proteolíticas

As peptidases, peptídeo-hidrolases ou proteases são enzimas hidrolíticas que clivam ligações peptídicas em proteínas ou em fragmentos de proteínas (peptídeos). As peptidases têm presença universal nos seres vivos e representam cerca de 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, participando de vias metabólicas e de vias de sinalização celular. Adicionalmente, muitos microrganismos secretam peptidases para o meio externo com a finalidade de degradar proteínas cujos produtos de hidrólise servem como fonte de carbono e de nitrogênio para a multiplicação celular (BARRETT *et al.*, 2001). Como as peptidases extraídas de plantas (papaína, bromelina e ficina) e de animais (peptidases digestivas) não atendem à demanda industrial, as peptidases microbianas passaram a ter grande relevância em diferentes setores da indústria. A produção industrial de peptidases por microrganismos é favorecida pelo pequeno tempo de geração, diversidade e facilidade de manipulação genética dos microrganismos (RAO *et al.*, 1998).

2.1 – Classificação das peptidases

Segundo o Comitê de Literatuta Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme), peptidases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e à subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). As peptidases (EC 3.4) que clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases (EC3.4.21-99), e as que atuam nas extremidades da cadeia, de exopeptidases (EC 3.4.11-19) (BOND & BUTLER, 1987; RAO *et al.*, 1998; BARRETT *et al.*, 2001).

As exopeptidases que atuam na região N-terminal da proteína são classificadas como aminopeptidases e as que atuam na região C-terminal são denominadas carboxipeptidases. A ação destas enzimas resulta na liberação de apenas um aminoácido (EC 3.4.11) ou de peptídeos com dois ou três resíduos de aminoácidos, que são substratos de peptidases específicas. Entretanto, a especificidade das peptidases não se relaciona apenas à posição da ligação peptídica ou ao tamanho na cadeia de resíduos de aminoácidos, existindo também seletividade em relação à sequência de aminoácidos vizinhos ao sítio ativo. Estes fatores têm dificultado a

elaboração de um sistema geral de classificação e de nomenclatura. Em resposta a este cenário, HARTLEY, em 1960, propôs uma classificação baseada na estrutura química do centro ativo. Segundo esta classificação, as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses de acordo com os grupos químicos do centro-ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Neste sistema, as carboxipeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.16.), metalo- (EC 3.4.17.) e cisteína carboxipeptidases (EC 3.4.18.). As endopeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico- (EC 3.4.23), metalo- (EC 3.4.24) e treonina endopeptidases (E.C. 3.4.25). Existe, atualmente, um sexto tipo catalítico, as glutâmico peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu centro ativo, mas que ainda não foram alocadas no sistema EC. As enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente elucidados são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99 (Tabela1) (HÄSE & FINKELTEIN, 1993).

Tabela 1: Classificação de peptidases de acordo com sítio catalítico: *Nomenclature Committee of the Internacional Union of Biochemistry and Molecular Biology, Enzyme nomenclature 1992, Academic press, Orlando, Flórida, 1992.*

Peptidases	EC subclasses
CARBOXIPEPTIDASES	
Serina carboxipeptidase	3.4.16
Metallo carboxipeptidase	3.4.17
Cisteína carboxipeptidase	3.4.18
ENDOPEPTIDASES	
Serina endopeptidase	3.4.21
Cisteína endopeptidase	3.4.22
Aspártico endopeptidase	3.4.23
Metallo endopeptidase	3.4.24
Treonina endopeptidase	3.4.25
Endopeptidase com mecanismo catalítico desconhecidos	3.4.99

Visando acompanhar os avanços na caracterização química e bioquímica das peptidases, o sistema MEROPS agrupa as enzimas de acordo com a sua estrutura terciária, considerando a ordem dos resíduos catalíticos ou sequências “motifs” em torno destes resíduos. Por este sistema, as peptidases são agrupadas em clãs que

englobam famílias. Os clãs são identificados por duas letras, sendo a primeira relacionada com o mecanismo catalítico; 'A' (aspártico), 'C' (cisteína), 'M' (metalo), 'S' (serina), 'T' (treonina), 'G' (glutâmico) ou 'U' (mecanismo desconhecido - Unknown) (BARRETT *et al.*, 2001).

2.2 – Peptidases na indústria de detergente

Atualmente, a grande maioria das peptidases usadas em detergentes é do tipo serina peptidase, como as subtilisinas ou peptidases alcalinas, produzidas por várias espécies de bactérias, destacando-se o gênero *Bacillus*. Produtos comerciais que contêm estas enzimas estão relacionados a seguir: Savinase, Alcalase, BPN e Carlsberg, dentre outras (GUPTA, BEG & LORENZ, 2002).

A aplicação de peptidases na formulação de detergentes aumentou nos últimos anos porque elas têm melhor desempenho na remoção de manchas e não afetam a cor dos tecidos, características estas reconhecidas pelos consumidores. Outros pontos positivos relacionam-se com a diminuição do uso de produtos químicos, como solventes e substâncias cáusticas, tornando os detergentes menos agressivos ao usuário e ao meio ambiente. Existem, também, vantagens com relação ao consumo de água e de energia (CASTRO, MENDES, & SANTOS, 2004). As peptidases são, também, usadas nas formulações de detergentes para lavagem de louça (SHOWELL, 1999). O uso de peptidases cresceu em importância e, recentemente, estas enzimas deixaram de ser simples aditivos nas formulações de detergentes passando a ser ingredientes chave. Um importante parâmetro na escolha das peptidases para detergentes é o valor do seu ponto isoelétrico (pI), porque estas enzimas agem melhor quando o valor do pH das soluções de detergentes é semelhante ao do pI da enzima. Contudo, existem outros parâmetros envolvidos na escolha de uma boa peptidase para detergentes, tais como: compatibilidade com os componentes do detergente (surfactantes, perfumes e branqueadores), boa atividade na temperatura de lavagem e eficiência na remoção das manchas (SHOWELL, 1999). Os detergentes são, geralmente, usados em temperaturas de lavagem elevadas. Entretanto, o aumento do uso de fibras sintéticas, que não suportam temperaturas elevadas, incentivou a identificação de enzimas que atuem em temperaturas baixas, já existindo no mercado um produto denominado Kannase contendo uma peptidase eficiente na faixa de temperaturas entre 10 e 20°C. Como as enzimas utilizadas na formulação de detergentes precisam ser estáveis na presença de agentes oxidantes e branqueadores,

a demanda tem direcionado o interesse industrial para a engenharia de proteínas, que envolve a mutação sítio-dirigida ou randômica, para a obtenção de enzimas modificadas com maior estabilidade (MAURER, 2004).

2.3 – Peptidases na indústria de alimentos

Em seu estado natural, as proteínas não contribuem tanto para o sabor dos alimentos quanto o fazem os seus produtos da hidrólise, os peptídeos e os aminoácidos. Assim sendo, as enzimas proteolíticas têm aplicação cada vez maior na melhoria de alimentos protéicos em relação ao seu sabor, aroma, textura, funcionalidade e a sua qualidade nutricional. As proteínas modificadas enzimaticamente podem também substituir gorduras e glicídeos, fornecendo ao alimento a textura e a viscosidade desejadas. Além disto, os peptídeos são muito mais reativos e interagem com os carboidratos e as gorduras dos alimentos, ajudando a criar sabores específicos. Peptidases são especialmente utilizadas na fabricação de aromatizantes para sopas e molhos, inicialmente produzidos por hidrólise de proteínas com ácido clorídrico. A importância dos aromatizantes na indústria de alimentos justificou o desenvolvimento de produtos enzimáticos comerciais para esta finalidade específica. Enzimas proteolíticas são também usadas na produção de extrato de levedura, ingrediente também muito usado para o preparo de sopas e molhos. Exopeptidases são utilizadas para reduzir o sabor amargo de queijos, e peptidases bacterianas restauram as propriedades emulsificantes das proteínas da soja desnaturadas pelo calor (BIRSCHBACH, HENDERSON & WILLRETT, 2004).

A hidrólise por peptidases é uma das estratégias usadas para a eliminação de epítomos alergênicos que podem estar presentes em alimentos ricos em proteínas, tais como peixes, frutos do mar, leite, trigo, soja, castanhas e amendoim. Os epítomos são sequências específicas de aminoácidos, presentes no alimento protéico, que interagem com as células do sistema imune, provocando uma resposta alérgica em indivíduos susceptíveis. O tratamento das proteínas do grão-de-bico com uma combinação de endopeptidases e exopeptidases reduz significativamente o seu potencial alergênico, sem afetar a qualidade nutricional (CLEMENTE *et al.*, 1999). Enzimas proteolíticas podem, também, ser utilizadas para a obtenção de peptídeos antimicrobianos usados na redução de patógenos em alimentos, aumentando, assim, a sua vida de prateleira. Como exemplo, a nisina, um conhecido peptídeo antimicrobiano, é usado para prevenir o crescimento de esporos de *Clostridium botulinum* em queijos processados (HILMI *et al.*, 2006).

O corpo humano produz uma grande quantidade de peptídeos ativos que atuam como mensageiros biológicos, estimuladores ou supressores de várias respostas fisiológicas. Evidências sugerem que peptídeos específicos derivados de alimentos protéicos podem mimetizar estes mensageiros biológicos, desempenhando um papel significativo na manutenção da saúde e na prevenção de doenças (GAUTHIER & POULIOT, 2003). Estes peptídeos bioativos podem ser produzidos *in vitro* por hidrólise enzimática de caseína, ovos, glúten do trigo, soja e proteínas do soro (BIRSCHBACH, HENDERSON, & WILLRETT, 2004).

2.4 – Peptidases em química fina

Peptidases microbianas, de plantas e de animais, como as enzimas termolisina, papaína e α -quimotripsina, são utilizadas na produção de dipeptídeos e tripeptídeos, a partir de aminoácidos, por inversão da reação de hidrólise. Este processo é aplicado com sucesso na obtenção de aspartame, angiotensina, dinorfina e encefalina (KUMAR & BHALLA, 2005).

As peptidases usadas na síntese de peptídeos são selecionadas tendo como base sua especificidade para os aminoácidos de interesse, sendo utilizadas endo- e exopeptidases comerciais, como metalo- e aspártico peptidases (KUMAR & BHALLA, 2005)

2.5 – Inibidores de peptidases na indústria farmacêutica

Várias peptidases têm importância médica como alvo quimioterápico de inibidores de origem natural ou sintética (VERMELHO *et al.*, 2007), pois são cruciais para a fisiologia e bioquímica de agentes etiológicos que causam diferentes doenças, tais como esquistossomose, malária, candidíase, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), hepatite e herpes, bem como desordens inflamatórias, imunológicas, respiratórias, cardiovasculares e neurodegenerativas (LEUNG, ABBENANTE, G. & FAIRLIE, 2000). Atualmente, existem vários inibidores proteolíticos capazes de controlar a progressão de algumas patologias. Para serem efetivos, os inibidores devem ser extremamente potentes e seletivos com relação à enzima alvo. Como fármacos em potencial, os inibidores de peptidases devem apresentar parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos favoráveis. Nesse sentido, os inibidores naturais desenvolvem funções importantes na regulação pós-traducional da atividade proteolítica nas células, enquanto os inibidores sintéticos são usados como ferramentas

relevantes na subclassificação das peptidases em seus principais grupos (ROOSE & VAN NOORDEN, 1995).

Os inibidores proteolíticos têm emergido também como potenciais fármacos de uso na terapêutica de inúmeros processos patológicos. Portanto, o conhecimento da interação das peptidases com seus respectivos substratos, bem como da especificidade destas enzimas, podem contribuir para o desenvolvimento de fármacos que possam inibir a sua ação. Através do estudo da estrutura proteica por raios X, usando a cristalização das enzimas ou em solução por ressonância magnética nuclear, e através do uso e do estudo de propriedades físico-químicas dos substratos sintéticos e da manipulação de suas estruturas moleculares, é possível a construção de inibidores proteolíticos por modelagem molecular (LEUNG, ABBENANTE, G. & FAIRLIE, 2000)

3 – Enzimas em microrganismos

Vale lembrar que os microrganismos têm sido usados desde a antiguidade em processos biotecnológicos, como na produção de pão, da cerveja, do vinho, do queijo, do iogurte e na preservação de alimentos. Na atualidade, têm sido também utilizados na produção de enzimas, antibióticos, solventes, aminoácidos, suplementos alimentares, e muitas outras substâncias, concomitantemente com a seleção de cepas altamente eficientes na produção desses produtos (MILLER & NAGARAJAN, 2000).

A diversidade microbiana é uma fonte importante em recursos genéticos para o avanço da Biologia e Biotecnologia. Estima-se que cerca de 4.300 enzimas (sequenciadas), 300 destas comercializadas (FERRER, 2004). Os microrganismos apresentam imensa diversidade genética e desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos (MYERS *et al.*, 2000).

Estudos recentes em Ecologia Molecular Microbiana demonstram que a extensão da diversidade microbiana na natureza é muito maior do que previamente pensado. Estratégias tradicionais de isolamento e seleção de microrganismos têm garantido o desenvolvimento de novos fármacos e aplicações na área de saúde, agricultura, indústria e meio ambiente (MYERS *et al.*, 2000).

Encontrar uma enzima significa encontrar uma nova função microbiana, portanto, deve-se examinar o maior número possível de microrganismos, através de um potente sistema de “screening”. Estima-se que 100 milhões de microrganismos

estão presentes em um grama de solo e que, portanto, há muitas enzimas ainda a serem descobertas.

4 – Produção de enzimas por microrganismos extremófilos

Existem microrganismos capazes de colonizar e proliferar em uma variedade de ambientes caracterizados por extremos de temperatura, salinidade ou valores de pH, que, à primeira vista, inviabilizariam qualquer forma de vida (SANTOS & DA COSTA, 2001). Para se adaptarem a condições ambientais extremas, os organismos foram obrigados a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas distintas. Devido às características “excêntricas” destes microrganismos, os componentes moleculares deles retirados possuem muitas vezes propriedades que os tornam especialmente adequados para utilização em processos industriais, como por exemplo: amilases, peptidases, lipases, xilanases e ligninases (SA-PEREIRA *et al.*, 2003).

A maior parte das enzimas utilizadas é extraída de organismos mesófilos; portanto, suas aplicações são, em geral, restritas, devido à limitada estabilidade nas temperaturas extremas (altas e baixas) e condições adversas de reação, como salinidade e pH extremos, bem como a presença de solventes orgânicos, dentre outras. As enzimas mesófilas e as termófilas extremas são estáveis e ativas em diferentes temperaturas, não havendo pressão evolutiva para que as mesófilas sejam estáveis e ativas em altas temperaturas e as termófilas em baixas temperaturas (CARREA & COLOMBO, 2000). Ou seja, apesar das enzimas termófilas possuírem atividade em altas temperaturas, estão restritas somente a este nicho.

Porém, quando levamos em consideração a adaptação a ambientes salinos, os microrganismos halotolerantes possuem estratégias de osmoadação que permitem a sobrevivência tanto em ambientes com elevada salinidade, como ambientes com baixa ou nenhuma salinidade. As enzimas produzidas por esses microrganismos, além de possuírem atividades em altos níveis de sal, podem ser usadas também num espectro muito mais amplo sem perder a eficiência (TRÜPER & GALINSKI, 1990).

A maneira como essas enzimas podem responder a esse leque de condições ambientais, sem perder a boa atividade, talvez seja o próximo passo na busca de “super-enzimas” para práticas industriais, já que muitas dessas práticas não utilizam somente condições extremas de salinidade, temperatura ou pH, mas sim, processos com ampla variações nessas condições. A alternativa para suprir essa necessidade tem sido a utilização de consórcios enzimáticos, onde diversas enzimas com atividade em diferentes condições atuam em conjunto num sistema de produção. Portanto, se

uma enzima for capaz de manter boa atividade sob diversas condições ambientais, os custos serão diminuídos e o rendimento da produção aumentado. A forma como esses microrganismos se adaptam a variações de salinidade e como essas enzimas suportam ambientes variados é fundamental para muitas áreas da biotecnologia.

5 – Adaptação a ambientes salinos

Microrganismos capazes de crescer na presença de sal são encontrados em todos os três domínios da vida: Archaea, Bacteria e Eukarya. Microrganismos não-halofílicos, capazes de crescer tanto na ausência, como na presença de sal, são designados halotolerantes. Os halotolerantes capazes de crescer acima de 15% (p/v) de NaCl (2,5 M) são considerados halotolerantes extremos. Microrganismos que requerem sal para o crescimento são referidos como halofílicos. Segundo a definição mais amplamente usada de KUSHNER (1978), é possível distinguir entre: halofílicos fracos [muitos organismos marinhos; a água do mar contém cerca de 3% (p/v) de NaCl]; halofílicos moderados [ótimo de crescimento entre 3 a 15% (p/v) de sal]; halofílicos extremos [ótimo de crescimento em 25% (p/v) de NaCl], halofílicos limítrofe extremo [requer pelo menos 12% (p/v) de sal].

Halofílicos extremos (arqueas da família *Halobacteriaceae* ou bactérias da família *Haloanaerobiales*) acumulam, em geral, íons inorgânicos (K^+ , Na^+ e Cl^-) em concentrações elevadas para contrabalançar a pressão osmótica externa e manter a integridade celular (Fig. 1). Esta forma de osmoadaptação evoluiu concomitantemente com modificações estruturais num grande número de componentes celulares. As proteínas destes organismos contêm um excesso considerável de resíduos com carga elétrica negativa e a atividade catalítica das enzimas depende da presença de sais, características moleculares de adaptação a ambientes com salinidade extrema. A composição de aminoácidos das proteínas é talvez o efeito mais óbvio e notável da elevada concentração de sal no citoplasma, mas outros componentes celulares, como os ribossomos, também apresentam modificações. Além disso, a parede celular das arqueas do gênero *Halobacterium* contém glicoproteínas com elevado número de aminoácidos carregados negativamente e que são estabilizadas por interação com íons sódio do meio exterior. Também as espécies do gênero *Halococcus* têm uma parede espessa constituída por um polissacarídeo sulfurado que é estabilizado por concentrações elevadas de sódio. Estas características das paredes celulares de arqueas extremamente halofílicas, parecem constituir o único exemplo claro de

adaptação da parede celular de arqueas a condições ambientais extremas (TRÜPER & GALINSKI, 1990).

Se esta estratégia de acumulação de elevados níveis de sais inorgânicos permite aos halofílicos extremos ocupar um nicho ambiental praticamente inacessível aos demais microrganismos, também é um fato que os restringe a esse mesmo nicho, impossibilitando-os de colonizar outras zonas de salinidade mais moderada ou sujeita a grandes alterações (GALINSKI, 1995). Em contraste, os halofílicos moderados utilizam, em geral, estratégias de osmoadação mais flexíveis que lhes permitem responder rapidamente a flutuações de salinidade do meio exterior. Neste caso, as estratégias de adaptação passam pelo acúmulo de solutos compatíveis, compostos orgânicos de baixa massa molecular, quer adquiridos do meio, quer sintetizados *de novo*, e que, mesmo em concentrações elevadas, são inofensivos para a funcionalidade das proteínas e de outros componentes celulares (GALINSKI, 1995) (Fig. 1).

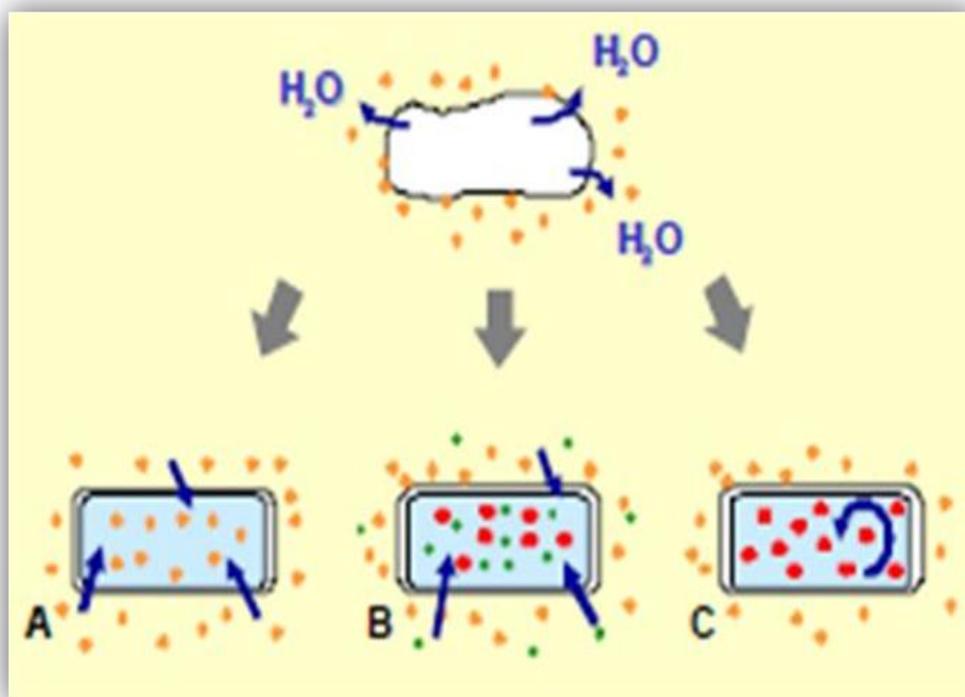


Figura 1: Diversas estratégias utilizadas por microrganismos em resposta a um aumento de salinidade do meio, de modo a manter o balanço osmótico. **A-** Aquisição de sais inorgânicos para o citoplasma (representados pelos círculos laranjas). **B-** Aquisição de solutos compatíveis (pontos verdes) presentes no meio extracelular. **C-** Síntese *de novo* de solutos compatíveis (círculos vermelhos) (SANTOS & DA COSTA, 2001).

Solutos orgânicos compatíveis compõem a grande parte dos compostos osmoticamente ativos no citoplasma das células. Solutos compatíveis são polares, altamente solúveis e a maioria deles não possuem carga no pH fisiológico. O acúmulo de solutos osmóticos "compatíveis" permite atingir o equilíbrio osmótico mantendo a atividade "convencional" de enzimas não-dependentes de sal (GALINSKI, 1993, 1995). Muitas células procarióticas contêm coquetéis de diferentes solutos compatíveis, em vez de depender de um único composto (GALINSKI, 1995). As concentrações dos solutos osmóticos são reguladas de acordo com a concentração de sal na qual as células se encontram. Esta concentração pode ser rapidamente ajustada, conforme necessário, quando a salinidade externa é alterada (por síntese ou absorção do meio mediante a um "choque" de salinidade, por degradação ou transformação em formas osmoticamente inativas ou por excreção após uma diluição estressante) (KNAPP, LADENSTEIN & GALINSKI, 1999). Assim, a utilização de solutos osmóticos orgânicos confere um elevado grau de flexibilidade e adaptabilidade. Solutos compatíveis exibem um efeito estabilizante que previne o desdobramento e desnaturação das proteínas, causados pelo aquecimento, congelamento e secagem (GALINSKI, 1995).

6 – Potencial biotecnológico de microrganismos halotolerantes e halofílicos

Microrganismos halotolerantes ou halofílicos, capazes de viver em ambientes salinos, oferecem um grande número de aplicações em diversas áreas da biotecnologia. Solutos compatíveis são úteis como estabilizadores de biomoléculas e células íntegras, antagonistas de sal, ou agentes preventivos de estresse. Biopolímeros, como biossurfactantes e exopolissacarídeos, são de interesse para biodegradação microbiana de derivados do petróleo. Outras biossubstâncias úteis são as enzimas, tais como novas isomerases e hidrolases, que são ativas e estáveis na presença de elevado teor de sal. Microrganismos halotolerantes desempenham um papel essencial na biotecnologia de alimentos para a produção e fermentação de alimentos e suplementos alimentares. A degradação ou transformação de uma gama de compostos orgânicos poluentes e a produção de energias alternativas são outros domínios de aplicações desses grupos de microrganismos extremófilos (MARGESIN & SCHINNER, 2001).

6.1 – Suplementos e corantes alimentares

Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPICL), tais como docosahexaenóico, ácido eicosapentaenóico, ácido araquidônico e ácido gama-linolênico, estão sendo utilizados como suplementos alimentares por suprir deficiência em ácidos graxos essenciais (NICHOLS *et al.*, 1993). Muitos AGPICL são obtidos a partir de óleo de peixe, que estão associados a vários problemas, como o odor indesejável e as dificuldades de purificação em larga escala. Além disso, os recursos haliêuticos (relativos à pesca) continuam diminuindo em todo o mundo. Uma fonte alternativa promissora são bactérias marinhas, que permite a utilização de procedimentos convencionais de purificação, rápidas taxas de produção e coerência entre qualidade do produto e produtividade. Bactérias marinhas da Antártica, principalmente espécies de *Shewanella* e *Colwellia*, contêm proporções relevantes de AGPICL (NICHOLS *et al.*, 1993).

O β -caroteno é utilizado na indústria alimentícia como um corante natural. Como é um precursor da vitamina A, é de importância como aditivo em cosméticos, preparações multivitamínicas e produtos alimentares mais saudáveis. Novas bactérias produtoras de carotenóides foram isoladas de solo salino no Egito. Uma bactéria halofílica extrema exibiu um crescimento ótimo e produção de carotenóides na presença de NaCl 25%. Essa bactéria produz 2,06 mg de carotenóides totais /célula, incluindo 0,06 mg de β -caroteno e 0,7 mg de cantaxantina (ASKER & OHTA, 1999). Este foi o primeiro relato de cantaxantina produzida por uma bactéria halofílica extrema. Cantaxantina é utilizada em cosméticos para diminuir o tempo necessário de exposição à luz solar para adquirir e intensificar um bronzeado.

6.2 – Enzimas produzidas por halofílicos e halotolerantes

6.2.1 – Hidrolases

Aminoácidos opticamente ativos são amplamente utilizados como produtos intermediários na indústria farmacêutica, para a síntese de antibióticos semi-sintéticos, hormônios peptídicos e pesticidas. Uma via para a síntese de diversos D-aminoácidos envolve a conversão de DL-5-hidantoínas substituídas, as quais são assimetricamente hidrolisadas para *N*-carbamoil-D-aminoácido por uma D-hidantoinase específica (dihidropirimidase). Posteriormente, o produto é quimicamente convertido para o D-aminoácido correspondente, sob condições ácidas. JOSHI e colaboradores

(2000) patentearam um novo processo para a preparação de D(-)N-carbamifenilglicina, utilizando hidantoinase de *Pseudomonas* halofílicas.

6.2.2 – β -galactosidase

β -galactosidases podem ser usadas como catalisadores na síntese de galactooligossacarídeo, utilizando lactose como substrato (BOON, VAN'T RIET & JANSSEN, 2000). Tais oligossacarídeos são utilizados como probióticos. A β -galactosidase de *Haloferax alicantei* tem atividade ótima a NaCl 4 M. A purificação da enzima foi facilitada pela capacidade do sorbitol em estabilizar a atividade da enzima na ausência de sal (HOLMES & SCOPES, 1997).

6.2.3 – Agarase

O ágar é um polissacarídeo complexo extraído de algas vermelhas marinhas, e poucas bactérias têm sido isoladas com a capacidade de degradar o ágar. Fontes de açúcar comercialmente disponíveis a partir de algas vermelhas poderiam fornecer aditivos economicamente rentáveis para produtos de alimentação animal ou humano. Já foi patenteado um sistema de produção de agarase por *Alteromonas* sp. (ATCC 43961), isolada de um pântano salino, o qual pode tolerar condições elevadas de temperatura, pH e variações de salinidade. Além disso, o sistema de agarase demonstrou ter uma elevada importância econômica na produção de oligossacarídeos, incluindo neoagarobiose, neoagarotetraose e neoagarohexaose. Essa enzima também poderia ser utilizada para o controle efetivo de contaminação por algas vermelhas ou para o tratamento de contaminantes marinhos submersos (WHITEHEAD, STOSZ & WEINER, 2001).

6.2.4 – α -amilase

A produção contínua de α -amilase halofílica pode ser realizada por células íntegras imobilizadas de *Halobacterium salinarum* em esferas de alginato e em filme de álcool polivinílico (BAGAI & MADAMWAR, 1997). Essas células são estáveis osmoticamente e demonstram produção contínua de enzima por 45 dias. As células imobilizadas podem ser permeabilizadas por tratamento com clorofórmio sem perda de componentes intracelulares. Usando este procedimento, as células podem ser

reutilizadas, sob condições de cultivo estabelecidas, para aplicações biotecnológicas. MOUNTFORT e colaboradores (1998) descreveram uma bactéria psicrófila, halófila e anaeróbica, que foi isolada de sedimentos anaeróbios de um lago com alta salinidade na Antártica. A bactéria foi designada como uma nova espécie, chamada de *Psychromonas antarcticus*. A capacidade amilolítica desse microrganismo é de amplo interesse biotecnológico, em virtude do bioprocessamento de amido ser realizado em baixas temperaturas.

6.2.5 – Isomerases

Uma DNA-topoisomerase termostável do tipo I da subfamília B foi isolada e purificada a partir da bactéria metanogênica hipertermofílica *Methanopyrus kandleri* (SLESAREV *et al.*, 1998). Essa nova enzima patenteada (designada topoisomerase V) é a primeira topoisomerase do tipo I da subfamília B conhecida em procarioto. Ela relaxa tanto positivamente quanto negativamente a molécula de DNA superenovelada e pode desenrolar DNA circular fechado (DNA c.c.c.). A enzima tem atividade em uma ampla gama de temperaturas e salinidade e não requer magnésio ou ATP para a sua atividade, o que torna as manipulações do DNA mais convenientes e eficientes.

6.2.6 – Peptidases produzidas por bactérias halófilicas moderadas

Muitos processos industriais normalmente são realizados sob condições adversas, e as enzimas disponíveis nem sempre podem manter valores ótimos de atividade e estabilidade nessas condições. Portanto, é de grande importância a busca de enzimas que possuam atividades em valores extremos de pH, temperatura e em diferentes concentrações de sais. Recentemente, tem-se demonstrado considerável interesse na busca de enzimas em microrganismos moderadamente halofílicos e em suas potenciais aplicações biotecnológicas (MELLADO *et al.*, 2004). Esta classe de enzimas halofílicas, embora execute funções enzimáticas semelhantes às não-halofílicas e às halofílicas extremas, exibem atividade tanto na presença como na ausência de sal. Por isso, demonstram ter um potencial para serem utilizadas em vários processos industriais onde ocorram variações constantes na concentração de sal (MOHAPARTA *et al.*, 1998). Alguns modelos de peptidases provenientes de halofílicos moderados têm sido relatados na literatura, como exemplos: (i) uma metalopeptidase produzida por *Pseudoalteromonas* CP76, isolada de salinas

localizadas na Ilha Cristina (Huelva, Espanha), que possui massa molecular de 38 kDa, atividade ótima a 55°C, em pH 8,5, possuindo ainda uma elevada tolerância a uma ampla variedade de concentrações de sal (NaCl 0-4 M) e termotolerância moderada (SÁNCHEZ-PORRO *et al.*, 2003); (ii) uma serina peptidase produzida por uma espécie aeróbia haloalcolifílica pertencente ao gênero *Salinivibri*, com massa molecular de 38 kDa, dependente de sal para a atividade e estabilidade, que apresentou atividade ótima a 60°C na presença de 2% de NaCl e CaCl₂ 2 mM, enquanto que na ausência de CaCl₂ apresentou ótimo de atividade a 50°C, em pH 8,0, com 80% de atividade residual em pH 9,0; esta enzima manteve ainda estabilidade por 24 h a 30°C, enquanto que a 50°C, na presença de CaCl₂, a meia vida foi de 5 h (LAMA *et al.*, 2005); (iii) uma serina peptidase produzida por uma bactéria halofílica, isolada da fermentação de molho de peixe Tailandês, denominada *Halobacillus* SR5-3, com massa molecular de 43 kDa, ótimo de atividade a 50°C, pH 9,0-10,0 em 20% de NaCl, apresentando atividade hidrolítica dobrada pela adição de 20-30% de NaCl (NAMWONG *et al.*, 2006); (iv) uma metalopeptidase produzida por *Salinivibrio* AF-2004, com massa molecular de aproximadamente 43 kDa, ótimo de atividade a 68°C, pH 8,5, NaCl 0-0,5 M, com elevada tolerância a concentrações de sal de até 4 M (KARBALAEI-HEIDARI *et al.*, 2007); (v) uma serina peptidase alcalina secretada por uma nova espécie de bactéria haloalcolifílica, isolada da Costa Saurashtra na Índia Ocidental, que possui massa molecular de 40 kDa, ótimo de atividade a 37°C, em pH 9,0-11,0, estabilidade entre pH 8,0-13,0 e entre NaCl 0-4 M (DODIA *et al.*, 2008); e (vi) uma serina peptidase secretada por *Halobacillus karajensis*, com massa molecular de aproximadamente 36 kDa, ótimo de atividade a 50°C, pH 9,0 e NaCl 0,5 M, embora em salinidade mais elevada (até 3 M) ainda tenha conservado relativa atividade hidrolítica, apresentando ainda atividade em uma ampla faixa de pH (8,0-10,0), com 55 e 50% de atividade remanescente em pH 6,0 e 11,0, respectivamente (HAMID *et al.*, 2009).

7 – Restingas: ambientes com potencial de isolamento de microrganismos halofílicos e halotolerantes

As restingas constituem um dos habitats que compõem a Mata Atlântica, sendo um dos poucos "hot spot" no planeta (MYERS *et al.*, 2000). Estes habitats são faixas localizadas em planícies costeiras, formadas por cordões de praias e dunas arenosas cobertas por vegetações herbáceas e herbáceo-arbustivas (MARANGOS, ARAUJO & BARBOSA, 1990). No passado, as restingas cobriam quase toda a extensão da costa

do Estado do Rio de Janeiro (exceto a costa rochosa) na Serra do Mar. A restinga é conhecida como corredor de biodiversidade (ROCHA *et al.*, 2005). No entanto, as restingas, por estarem localizadas em zonas costeiras, passaram por intensos processos de degradação que resultaram em uma acentuada alteração e perda deste habitat (ROCHA *et al.*, 2008). A contínua modificação da paisagem levou a uma considerável perda anual de áreas de restinga devido ao desmatamento (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA-INPE, 2009). O Estado do Rio de Janeiro é uma das porções da costa brasileira com a mais elevada taxa de ocupação humana e, portanto, as suas restingas estão sob uma das mais elevadas taxas de pressão antrópica.

Apesar da sua forte presença ao longo da costa brasileira e de estarem localizadas em áreas com elevada densidade humana, as restingas ainda são relativamente mal-compreendidas cientificamente em vários aspectos da sua biodiversidade e do seu estado de conservação (ROCHA *et al.*, 2005). A maioria do que se conhece sobre habitats de restinga está concentrada no Sudeste do Brasil, mas, mesmo nesta região, apenas algumas localidades, como Maricá e Jurubatiba (no Estado do Rio de Janeiro) e Setiba (no Estado do Espírito Santo) são relativamente bem conhecidas (PETRUCIO & ESTEVES, 2000; ROCHA *et al.*, 2005). Uma grande parte do conhecimento sobre restinga é constituída de informações sobre a sua geomorfologia (WHITE, 1986), limnologia (FARJALLA *et al.*, 2006; ESTEVES *et al.*, 2008) e vegetação (GUIMARAES *et al.*, 1997; MOURAO & BELTRATI, 2001). No entanto, o conhecimento sobre a fauna de vertebrados é, comparativamente, ainda incipiente e restrito (ROCHA *et al.*, 2005). Quanto a vertebrados terrestres, a maioria dos estudos disponíveis sobre restinga trata de espécies ou comunidades de répteis (ROCHA *et al.*, 2005) e, em menor escala, de anfíbios (GOMES *et al.*, 2004; GARGAGLIONI *et al.*, 2007), aves (DORNELES & WAECHTER, 2004) e mamíferos (ROCHA *et al.*, 2007). Para a maioria dos habitats de restinga, não existe sequer uma lista de espécies de vertebrados (ROCHA *et al.*, 2008). Entretanto, se a restinga é relativamente ainda mal compreendida quanto às espécies de vertebrados, esse mau entendimento se multiplica infinitas vezes quando relacionado às espécies de microrganismos presentes nessas regiões.

7.1 – Restinga de Jurubatiba

O Parque Nacional da Restinga da Jurubatiba (ou PARNA de Jurubatiba) é o primeiro Parque Nacional no Brasil a compreender exclusivamente o ecossistema de restinga, representado no Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza. A maioria dos pesquisadores concorda que Jurubatiba é a área de restinga mais bem preservada do país e está praticamente intacta (ARAÚJO *et al.*, 1998). Localiza-se na região norte do Estado do Rio de Janeiro, abrangendo as planícies fluviais e marinha do litoral dos municípios de Quissamã, Carapebus e Macaé (Figura 2).

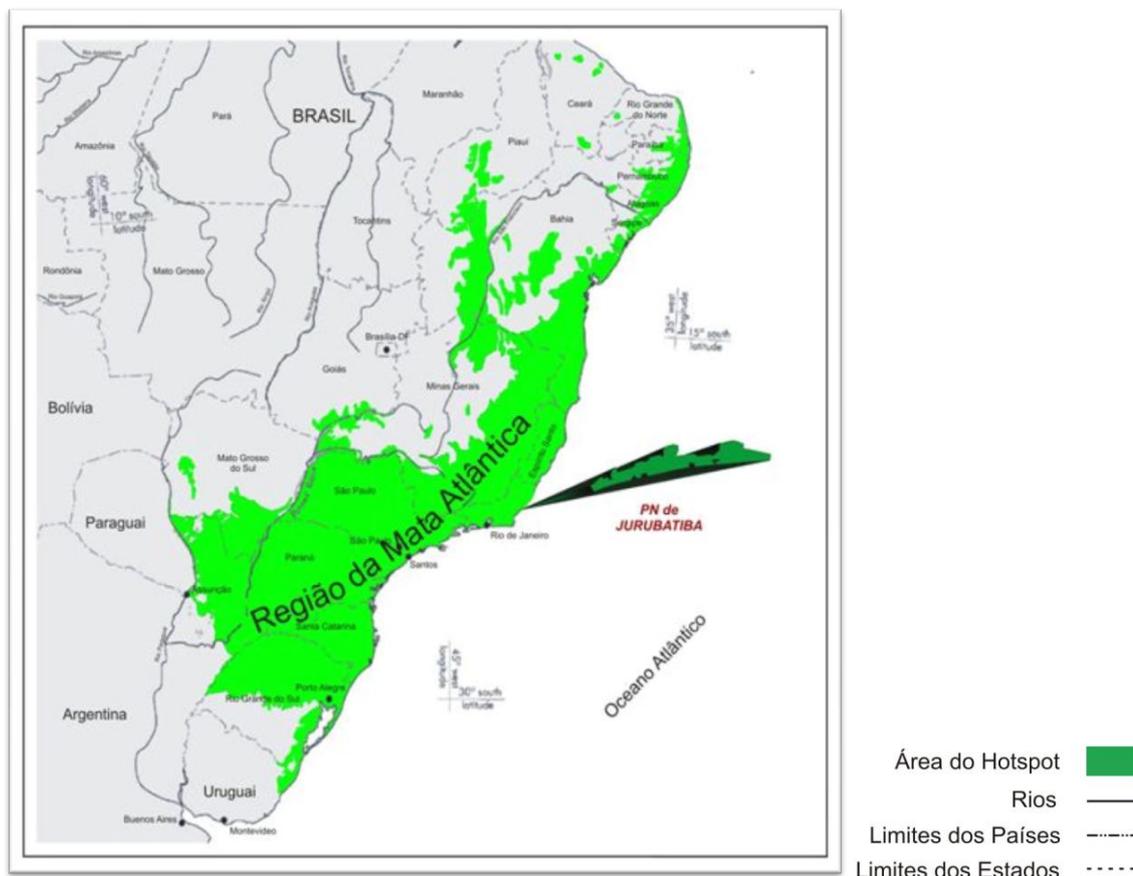


Figura 2: Localização do “Hotspot” do Bioma da Mata Atlântica, com destaque da localização do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (Cartografia: ©2002 Conservação Internacional / Laboratório de SIG e Mapeamentos).

A restinga de Jurubatiba compreende uma faixa de orla marítima com 14.860 hectares de área e 44 Km de extensão ao longo da praia, com cerca de 2 Km de largura na extremidade oeste, ao lado da lagoa Cabiúnas e 4,8 Km de largura na extremidade leste (canal de Ubatuba), com um perímetro de 123 Km. Da área total, 62,38% está no município de Quissamã. Essa restinga, a maior do país, foi formada a partir do recuo do mar durante o período Quaternário (Figura 3). A justaposição

sucessiva de depósitos arenosos paralelos à costa criou dunas de três a oito metros de altura, com até dez metros de largura, dando origem à planície arenosa e a, pelo menos, dezoito lagoas (ARAÚJO *et al.*, 1998). A lagoa Preta de Jurubatiba é o único lugar do mundo em que se encontra o micro-crustáceo *Diaptomus azuros*, que só tem similar na costa oeste da África, provando, portanto, que este continente já foi unido com a costa do Brasil em tempos remotos (ESTEVES & LACERDA, 2008).



Figura 3: Imagens da Restinga de Jurubatiba. (<http://www.quissama.rj.gov.br/index.php/2009/05/06/o-municipio-juribatiba> acessado em 10/06/2010)

Recentemente, a expansão da indústria turística gerou a ocupação das praias de Carapebus (lagoa de Carapebus), João Francisco (lagoa de Piripiri) e Visgueiro (lagoa do Visgueiro) por casas de veraneio. Também se iniciou o aproveitamento "das areias" com plantações de coco e abacaxi. Outro aspecto foi a expansão de campos plantados para criação de gado. Com o incentivo de várias organizações e pessoas que defendiam a proteção da região, o Parque Nacional de Jurubatiba foi criado por lei federal de 1998 e reconhecido em 1992 como reserva da biosfera pela UNESCO num estudo assinado por 126 cientistas.

Os solos são basicamente do tipo regossolo, sendo também encontrados solos salinos e orgânicos. O verão é quente e chuvoso e o inverno, mais seco. A temperatura média anual varia em torno de 22°C e 24°C e a precipitação anual entre 1.000 mm e 1.350 mm. O Parque abrange formações vegetacionais que variam desde a praia (formação rastejante), passando por arbustos esparsos, áreas permanentemente ou periodicamente alagadas, até as florestas altas nos locais mais distantes do mar. Uma espécie de planta com formação rastejante, que é amplamente encontrada na beira de praias dessa restinga, é a *Blutaparon portulacoides* (Figura 4). Essa planta é uma erva

perene e rizomata, com um derramado de folhas espesso e frequente, que primeiro colonizou as dunas na costa litorânea das praias a sudoeste do Oceano Atlântico (FARIAS & FLORES, 1989). No Brasil, é comumente encontrada na faixa de areia paralela à linha da praia na Restinga de Jurubatiba e é capaz de tolerar bem esta zona de estresse de salinidade, de alta temperatura e exposição a alterações de marés (BERNAARDI & SEELEGER, 1989). *B. portulacoides* é também de grande interesse medicinal, devido à presença de flavonóides, irisona B, sitosterol, ácido vanílico e os esteróides estigmasterol, sitosterol e campesterol (FERREIRA & DIAS, 2000). No entanto, existe pouca informação disponível sobre a população microbiana associada com as raízes de *B. portulacoides*. Assim, explorar a diversidade dessa população pode gerar uma fonte em potencial para a descoberta de novas estirpes e compostos bioativos (BARBOSA *et al.*, 2006).



Figura 4: *Blutaparon portulacoides* – espécie de planta com formação rastejante, que é amplamente encontrada na beira de praias da Restinga de Jurubatiba (<http://www.quissama.rj.gov.br/index.php/2009/05/06/o-municipio-juribatiba> acessado em 10/06/2010)

Nesse contexto, bactérias Gram-positivas halotolerantes e formadoras de esporos foram isoladas a partir da raiz, rizosfera e solo não-rizosférico de *B. portulacoides*, o que gerou um total de 38 isolados pertencentes aos gêneros *Halobacillus*, *Virgibacillus* e *Oceanobacillus*. Dentre estes isolados, uma nova espécie de bactéria foi isolada da raiz, apresentando as seguintes características: halofílica moderada, Gram-positiva e formadora de esporos. A estirpe, designada M9, é dotada de mobilidade e estritamente aeróbia. Esta bactéria cresce na ausência de NaCl bem como na presença de até 20% de NaCl, sendo capaz de hidrolisar caseína e amido. A análise filogenética com base em sequências do gene que codifica o rRNA 16S (*rrs*) mostrou que a cepa M9 pertencia ao gênero *Halobacillus* e que exibia uma similaridade

entre 97,8 a 99,4% com as estirpes-tipo de outras nove espécies de *Halobacillus*. A homologia DNA-DNA da estirpe M9 com *H. trueperi*, a espécie mais próxima, no que diz respeito à semelhança do gene *rrs*, e *H. locisalis* foi de 21% e 18%, respectivamente. Portanto, com base nos dados fenotípicos, genotípicos e filogenéticos, a estirpe M9 foi alocada no gênero *Halobacillus*, como um membro de uma nova espécie denominada *Halobacillus blutaparonensis*, referindo-se ao gênero da planta a partir da qual a cepa foi isolada em associação com as raízes (BARBOSA *et al.*, 2006).

JUSTIFICATIVA

A expansão da biocatálise é particularmente relevante para o Brasil. A tecnologia enzimática concilia o desenvolvimento tecnológico com o uso de matérias-primas renováveis e com a preservação ambiental, questão fundamental para o país, visto que o meio ambiente brasileiro é um ativo de valor incalculável e que contribui decisivamente para a representatividade brasileira no cenário internacional. O avanço da tecnologia enzimática no Brasil é favorecido pela enorme quantidade e variedade de matérias-primas renováveis passíveis de serem transformadas, por via enzimática, em produtos úteis de maior valor agregado. Há também no país o necessário conhecimento das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, por processos fermentativos e extrativos, assim como a maior biodiversidade do planeta como fonte de biocatalisadores. Agregar valor a essa biodiversidade parece ser uma das únicas formas que restou para preservá-la. Por esse motivo, a busca de enzimas através da biodiversidade microbiológica é uma forma de valorizar e divulgar essa riqueza. Sem dúvida, a descoberta de novas espécies amplia as possibilidades de identificação de novas enzimas hidrolíticas com possível aplicação em diferentes setores industriais.

OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a produção de enzimas proteolíticas pela bactéria halofílica moderada *Halobacillus blutaparonensis* (cepa M9), bem como estudar algumas de suas propriedades bioquímicas. Para tal, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

1 – Avaliar a cinética de crescimento celular de *H. blutaparonensis* M9, quando cultivada em meio de cultura contendo diferentes concentrações de sal;

2 – Determinar o perfil de peptidases celulares e extracelulares produzidas após o cultivo da estirpe M9 em meios contendo diferentes concentrações de sal;

3 – Caracterizar bioquimicamente as enzimas proteolíticas secretadas pela estirpe M9, quanto ao pH ótimo, temperatura, sensibilidade frente a diferentes concentrações de sal, capacidade de hidrolisar diferentes substratos protéicos, susceptibilidade a diferentes inibidores proteolíticos e íons divalentes, bem como estudar sua estabilidade a diferentes valores de temperatura e pH.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Microrganismo e condições de cultivo: No presente trabalho foi utilizada a estirpe M9 de *Halobacillus blutaparonensis*, isolada das raízes de *Blutaparon portulacoides*, uma planta encontrada em solo arenoso, paralelo à praia na Restinga de Jurubatiba, Rio de Janeiro, Brasil (BARBOSA *et al.*, 2006). A estirpe foi cultivada em meio LB ('Lauria-Bertani Broth' – Triptona 1%; NaCl 0,5%; extrato de levedura 0,5%) (SCHLEIF & WENSINK, 1981).

2 – Cinética de crescimento celular: Para a construção da curva de crescimento, a estirpe M9 foi cultivada em meio de cultura LB suplementado com diferentes concentrações de sal. Para tal, foi inoculado 100 µL de um pré-cultivo em cinco tubos contendo 20 mL do meio com diferentes concentrações de NaCl (0,5%; 2,5%; 5%; 10% e 20%), incubados durante 24, 48, 72 e 96 h a 32°C. Após cada período de tempo determinado foram feitas diluições variando-se de 10^{-3} a 10^{-6} . Um volume de 100 µL de cada diluição foi semeado, em triplicata, através da técnica de "spread-plate", em placas contendo meio LB com a respectiva concentração de NaCl. Em seguida, essas placas foram incubadas durante 48 h para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC).

3 – Obtenção dos extratos celulares e extracelulares: Para obtenção do pré-inóculo, a cultura foi crescida em meio LB contendo NaCl 2,5% por 48 h; 2 mL deste pré-inóculo foram adicionados a 100 mL de meio LB contendo 0,5% e 2,5% de NaCl, que foram incubados por 48 h a 32°C. Após este período de incubação, as respectivas culturas foram centrifugadas a 10000 g (centrífuga Sorwall RC5B), durante 20 min, a 4°C. Os sobrenadantes foram submetidos à concentração e retirada de sal utilizando-se sistema Amicon (Stirred Cell Model 8200), sendo, em seguida, estocados a -20°C. Para obtenção do extrato celular, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato-salina (PBS; NaCl 150 mM, tampão fosfato 20 mM, pH 7,2). As bactérias foram então ressuspensas em 500 µL de PBS suplementado com Triton X-100 0,1%. Um número equivalente em volume de esferas de vidro (0,3 mm de diâmetro) foi então adicionado. As bactérias foram lisadas em um homogenizador de células ("Fast Prep" - Qbiogene/BIO101), alternando 2 min de agitação com intervalos de 5 min no gelo (5

ciclos). As suspensões foram centrifugadas a 10000 g por 10 min a 4°C, e os sobrenadantes foram chamados de extratos celulares.

4 – Determinação da concentração de proteínas: As concentrações de proteínas dos extratos celulares e extracelulares foram determinadas segundo o método descrito por LOWRY e colaboradores (1951), utilizando-se soro albumina bovina (BSA) como proteína padrão.

5 – Atividade proteolítica em SDS-PAGE: As peptidases foram evidenciadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%, contendo 2% de gelatina como substrato co-polimerizado ao gel, de acordo com o método descrito por HEUSSEN & DOWDLE (1980). Aos géis foram aplicados aproximadamente 50 µg de proteínas correspondentes a cada sistema (extratos celulares e extracelulares). Em seguida, foi realizada uma eletroforese com corrente elétrica contínua de 120 V, a 4°C. Ao término da corrida, os géis foram incubados com Triton X-100 2,5% (diluído em água destilada) durante 1 h, à temperatura ambiente, com agitação suave. Os géis foram, então, lavados com água destilada e incubados por 24 h a 37°C, em tampão fosfato de sódio 50 mM (PBS) pH 7,0. Depois da digestão enzimática, a revelação das bandas líticas foi realizada através da coloração dos géis com Comassie brilliant blue R-250 0,1% em metanol: ácido acético: água (40:10:50 v/v/v). Para melhor visualização dos halos de hidrólise, os géis foram descorados em uma solução contendo metanol 5% e ácido acético 7% em água, à temperatura ambiente, com agitação suave. Ao final desta etapa, os géis foram mantidos em água destilada por 1 h, fotografados e empacotados em papel celofane com gelatina a 2%. As massas moleculares aparentes das peptidases foram determinadas através da comparação da posição de proteínas padrões com massas moleculares conhecidas (Full Range Rainbow – RPN 800 - Amersam Life Science).

6 – Dosagem química da atividade proteolítica: Para quantificar a atividade proteolítica, 10 µL dos extratos bacterianos foram adicionados a 270 µL de tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 7,0, suplementado com NaCl 0,5 M e 100 µL de uma solução de hemoglobina (10 mg/mL). Em seguida, as misturas de reação foram incubadas por 24 h a 37°C. Para interromper a reação, foram adicionados 500 µL de

ácido tricloracético 5% gelado. Após 10 min de incubação em gelo, foi realizada centrifugação a 10.000 g por 8 min. para separar a hemoglobina íntegra da degradada. A leitura do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 280 nm. O aumento de 0,001 na absorbância foi considerado como o equivalente a 1 unidade arbitrária (UA). Para determinação da atividade proteolítica, a unidade arbitrária foi dividida pela concentração de proteínas em mg (UA/mg). Todas as misturas de reação e os controles foram preparados em triplicata (DIVIESO *et al.*, 2007)

7 – Caracterização bioquímica das peptidases extracelulares

7.1 – Quanto ao pH ótimo da atividade: O efeito do pH na atividade proteolítica foi determinado utilizando-se SDS-PAGE contendo gelatina como substrato (como descrito no item 5) e através da dosagem química da atividade proteolítica (como descrito no item 6). Os géis ou as misturas reacionais da dosagem química foram incubados em diferentes sistemas tampões: citrato de sódio 10 mM (pH 3,0), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,0) e glicina NaOH 20 mM (pH 9,0 e 11,0).

7.2 – Quanto ao grupamento químico presente no sítio ativo: A classe das peptidases foi determinada através de SDS-PAGE contendo gelatina (como descrito no item 5) e através da dosagem química da atividade proteolítica (como descrito no item 6). Os géis ou as misturas reacionais foram incubados, separadamente, por 24 h no melhor pH, contendo os seguintes inibidores proteolíticos: 1,10-fenantrolina 10 mM, EDTA 10 mM (inibidores de metalopeptidases), antipaína 10 µM, PMSF 10 mM e TLCK 100 µM (inibidores de serina peptidases). Então, os resultados foram comparados com um controle que foi incubado em tampão de digestão sem nenhum dos inibidores.

7.3 – Quanto à sensibilidade a diferentes concentrações de NaCl: O efeito da salinidade na atividade proteolítica foi determinado através de SDS-PAGE contendo gelatina (como descrito no item 5) e através da dosagem química da atividade proteolítica (como descrito no item 6). Os géis ou as misturas reacionais foram incubados no melhor sistema tampão contendo diferentes concentrações de NaCl (0,5%; 2,5%; 5%; 10% e 20%).

7.4 – Quanto à temperatura: A atividade das peptidases extracelulares também foi analisada através de SDS-PAGE contendo gelatina (como descrito no item 5) com posterior incubação durante 24 h em diferentes temperaturas (4, 25, 37, 40, 50 e 65°C) em PBS, pH 7,0.

7.5 – Termoestabilidade: A estabilidade térmica das enzimas proteolíticas secretadas foi avaliada após incubação do sobrenadante em PBS, pH 7,0, por 15 e 30 min, em diferentes temperaturas: 4, 25, 37, 40, 50 e 65°C. Imediatamente após cada período de tempo, os sobrenadantes foram quantificados para a atividade proteolítica como descrito no item 6.

7.6 – Estabilidade ao pH: Os sobrenadantes foram incubados por 15 e 30 min em diferentes valores de pH (3,0, 5,0, 7,0 e 9,0). Em seguida, a atividade enzimática foi ensaiada através de dosagem química, como descrito no item 6.

7.8 – Efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica: O sobrenadante foi pré-incubado por 30 min com os seguintes íons divalentes, na concentração de 10 mM: cálcio, manganês, magnésio, cobre, cobalto, zinco e ferro. Em seguida, a atividade enzimática foi ensaiada através de dosagem química, como descrito no item 6. Adicionalmente, os íons que modularam a atividade enzimática foram ensaiados em diferentes concentrações (0,001 a 1 mM).

8 – Hidrólise de diferentes substratos protéicos: Com a finalidade de evidenciar a capacidade das enzimas proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis* em hidrolisar diferentes proteínas, realizou-se um SDS-PAGE com diferentes substratos protéicos co-polimerizados ao gel. Os substratos utilizados foram: gelatina, BSA, caseína e hemoglobina.

9 – Análises densitométricas das bandas proteolíticas

As análises dos perfis proteolíticos sob diferentes condições de temperatura, pH e salinidade, foram determinados através de SDS-PAGE contendo gelatina como substrato co-polimerizado (como descrito no item 5). A quantificação dos halos de

digestão enzimática foi realizada por densitometria utilizando-se o *software* Image J, de domínio público. Para tal, inicialmente as imagens dos géis foram submetidas à inversão de cores, transformando as áreas de hidrólise inicialmente brancas em tons de cinza. A partir deste passo, os géis foram submetidos à análise densitométrica. O tamanho dos picos gerados pela análise densitométrica é proporcional ao tamanho e à densidade da banda no gel que, por sua vez, é proporcional à atividade proteolítica.

10 – Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste *t* de Student usando-se o programa GraphPad Prism 3. Os valores de *P* menores ou iguais a 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

1 – Cinéticas de crescimento celular

O comportamento do crescimento da estirpe M9 foi analisado a partir da estimativa do número de células viáveis. A estirpe foi cultivada em meio de cultura LB, suplementado com diferentes concentrações de sal (0,5%, 2,5%, 5,0%, 10% e 20% de NaCl), durante um período total de 4 dias (96 h), sendo o número de células (unidades formadoras de colônia – UFC) avaliado a cada 24 h. Em todos os casos, o crescimento celular foi avaliado à temperatura de 32°C, sob agitação contínua.

O crescimento ocorreu tanto em meio com o mínimo de concentração de sal – NaCl 0,5% (quantidade de sal utilizado na composição normal do meio LB) – como em meio suplementado com até 10% de NaCl (Fig. 5). Não foi observado crescimento em meio suplementado com NaCl 20% durante o intervalo de 4 dias.

No meio LB suplementado com NaCl 0,5%, o pico de crescimento celular foi atingido em 48 h de incubação. O número de células viáveis estimadas para esse tempo de cultivo foi em torno de $1,3 \times 10^9$ UFC/mL (Fig. 5a).

No meio LB suplementado com NaCl 2,5%, o pico de crescimento celular foi atingido em 24 h de incubação. O número de células viáveis estimadas para esse tempo de cultivo foi em torno de $2,0 \times 10^{10}$ UFC/mL (Fig. 5b).

No meio LB suplementado com NaCl 5,0%, o pico de crescimento celular foi atingido em 24 h de incubação. O número de células viáveis estimadas para esse tempo de cultivo foi em torno de $8,0 \times 10^8$ UFC/mL (Fig. 5c).

No meio LB suplementado com NaCl 10%, só foi detectado crescimento após 72 h de cultivo, sendo o número de células viáveis, estimadas em 96 h, de aproximadamente $2,3 \times 10^9$ UFC/mL (Fig. 5d).

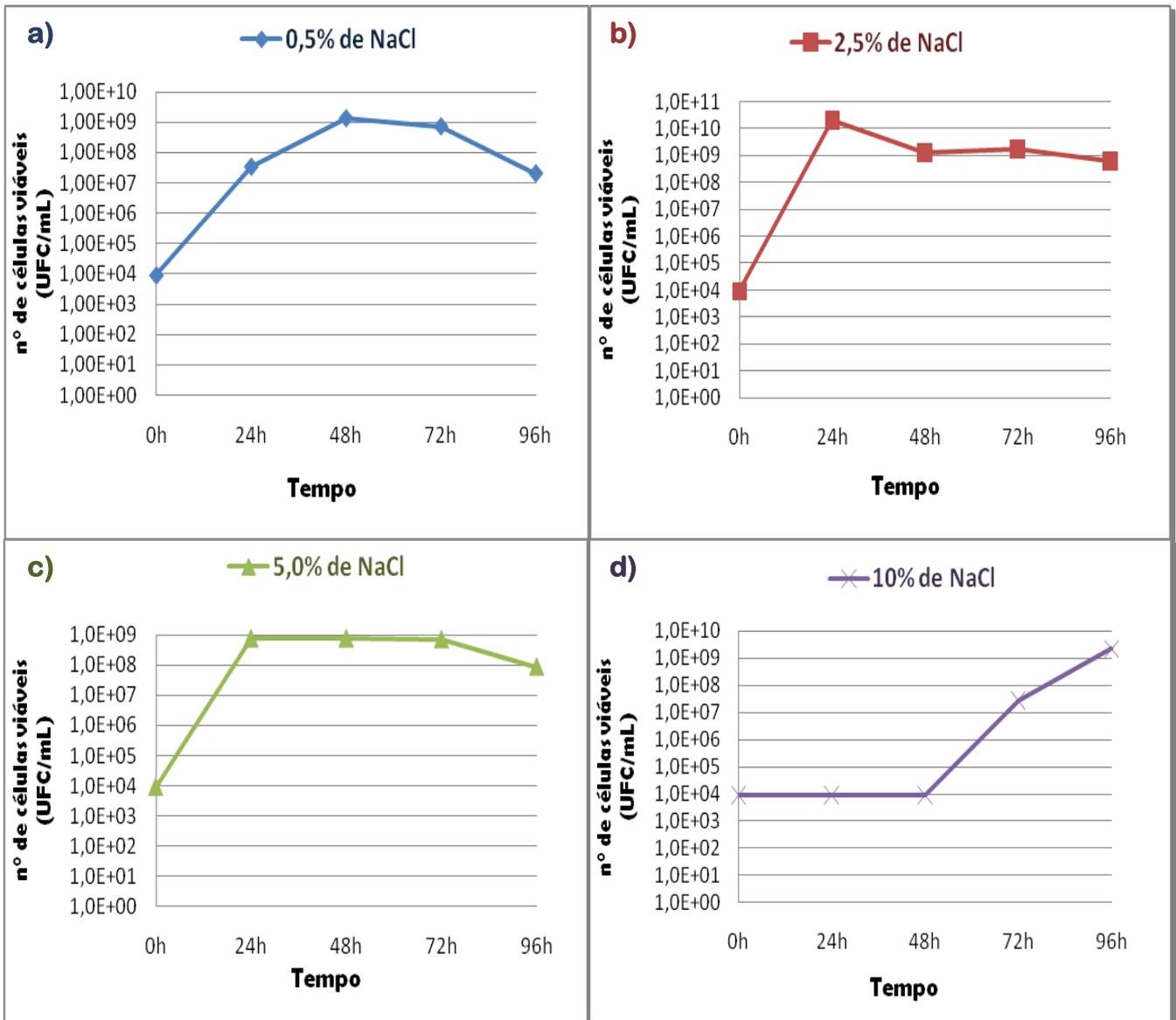


Figura 5: Número de células viáveis após crescimento de *H. blutaparonensis* em meio LB suplementado com 0,5% (a), 2,5% (b), 5,0% (c) e 10% (d) de NaCl. O tempo total de incubação foi de 96 h, com a contagem do número de células viáveis (UFC) a cada 24 h. O cultivo ocorreu a 32°C sob agitação.

Os resultados obtidos nos cultivos com meio LB suplementado com as quatro diferentes concentrações de sal indicaram que a utilização do meio LB suplementado com NaCl 2,5% oferece uma maior quantidade de número de células em 24 h de incubação. A quantidade do número de células foi, em média, dez vezes maior neste meio em comparação com as outras condições testadas (Fig. 6). O sobrenadante obtido desse meio de cultura foi, então, utilizado em todos os experimentos posteriores de identificação e caracterização de possíveis peptidases produzidas por essa nova espécie bacteriana.

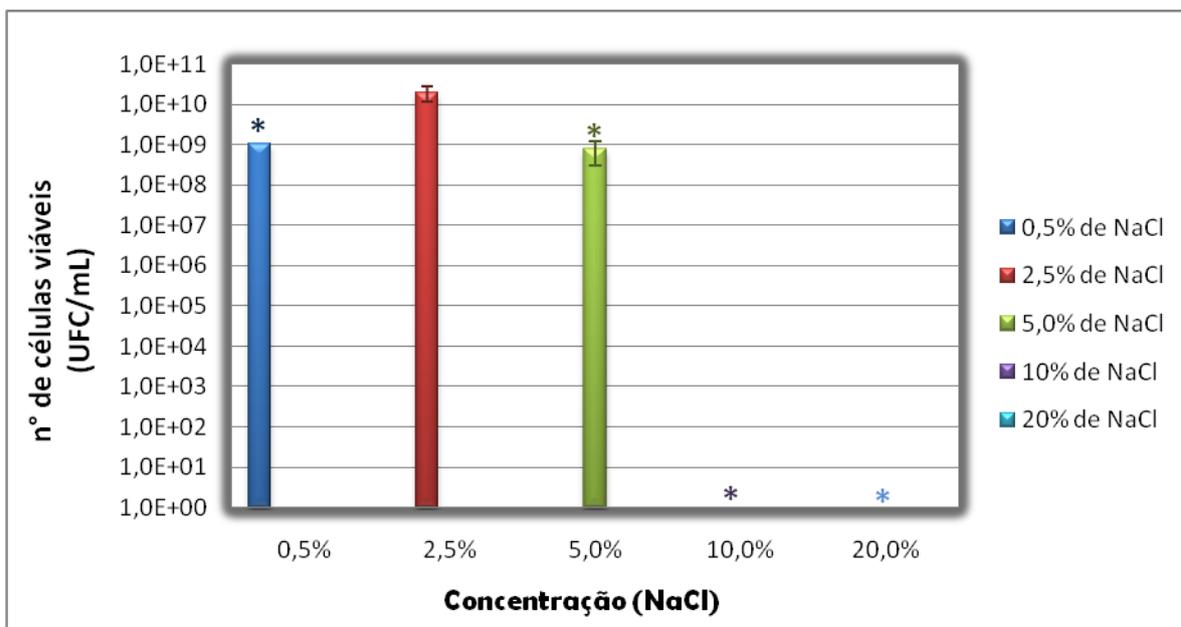


Figura 6: Comparação dos picos de crescimento celular, da estirpe *H. blutaparonensis* M9, após 24 h de incubação em meio LB suplementado com quatro concentrações de sal diferentes (0,5%, 2,5%, 5,0% e 10% de NaCl). A incubação ocorreu a 32°C sob agitação. Os asteriscos denotam as diferenças estatísticas ($P < 0,05$) entre o crescimento a 2,5% de NaCl e as demais concentrações.

2 – Perfis de proteínas

Para a análise eletroforética em gel de poliácridamida dos extratos celulares e sobrenadantes de cultivo da bactéria *H. blutaparonensis*, foi aplicada a mesma concentração de proteína, em torno de 50 µg, em cada poço do gel. Os perfis de proteínas correspondentes às bactérias cultivadas em meio LB normal (0,5%) e com adição de 2,5% de NaCl foram muito semelhantes, compostos por aproximadamente 30 polipeptídeos de massas moleculares variando de 15 a >120 kDa (Fig. 7). Os perfis dos extratos celulares, em 0,5 e 2,5% de NaCl, mostraram-se muito mais complexos quando comparados aos perfis dos sobrenadantes de cultivo. No sobrenadante correspondente a 0,5% de NaCl não foi detectada nenhuma banda de proteína. Já no sobrenadante correspondente a 2,5% de NaCl, proteínas com massas moleculares >120, 70, 60, 45 e <35 kDa foram detectadas, demonstrando que a condição de cultivo em que há secreção de parte do repertório protéico celular é em meio contendo acréscimo de 2,5% de NaCl (Fig. 7).

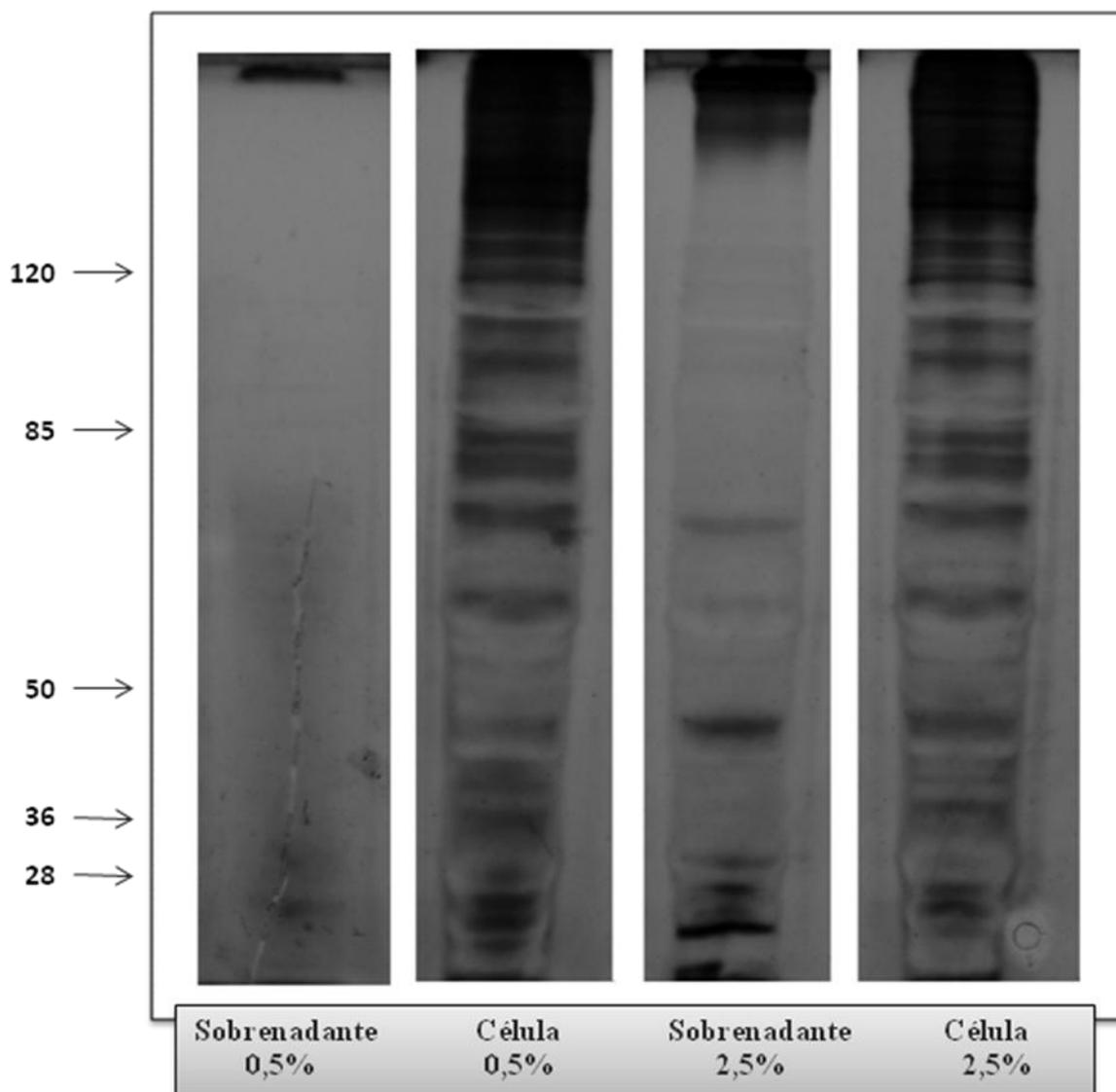


Figura 7: Perfis protéicos observados nos sobrenadantes e nos extratos celulares de *H. blutaparonensis* crescida em LB com 0,5% e com acréscimo de 2,5% de NaCl. Os números da esquerda se referem às massas moleculares das proteínas padrões, expressos em kilodaltons (kDa).

3 – Perfis proteolíticos: efeito de diferentes condições de cultivo

Com a finalidade de evidenciar as atividades proteolíticas presentes nos extratos celulares e nos sobrenadantes de cultivo de *H. blutaparonensis*, crescida em meio LB (NaCl 0,5%, concentração normal utilizada na composição do meio) e com acréscimo de 2,5% de NaCl, realizou-se um SDS-PAGE utilizando-se a gelatina como substrato co-polimerizado ao gel. A concentração de proteínas aplicada em cada “slot” do gel foi a mesma, em torno de 50 µg, para que assim pudessemos estabelecer um critério de comparação entre estas diferentes condições de cultivo. Após a digestão enzimática, observou-se uma maior atividade proteolítica no sobrenadante celular correspondente ao cultivo da bactéria em meio acrescido de 2,5% de NaCl, composto de 3 halos de

proteólise com massas moleculares de aproximadamente 45, 35 e 28 kDa (Fig. 8). O perfil proteolítico observado no extrato celular em 2,5% de NaCl foi semelhante ao sobrenadante, porém, com menos intensidade de atividade. O halo proteolítico de 45 kDa também foi evidenciado no sobrenadante de 0,5%, porém com menor intensidade de hidrólise (Fig. 8). Já no extrato celular a 0,5% não foram detectadas atividades proteolíticas. Estes dados sugerem que os perfis proteolíticos no meio LB (0,5%) e em meio com acréscimo de 2,5% de NaCl são semelhantes, diferindo apenas na quantidade de peptidase produzida. Isso talvez se deva à exorbitante diferença na quantidade de células presentes nessas distintas condições de cultivo. No meio com acréscimo de 2,5% de sal o número de UFC/mL foi em torno de sete mil vezes maior quando comparado ao meio LB (0,5%), o que reforça a sugestão de que a melhor condição de cultivo para obtenção de peptidases é em meio acrescido de 2,5% de NaCl (Fig. 8).

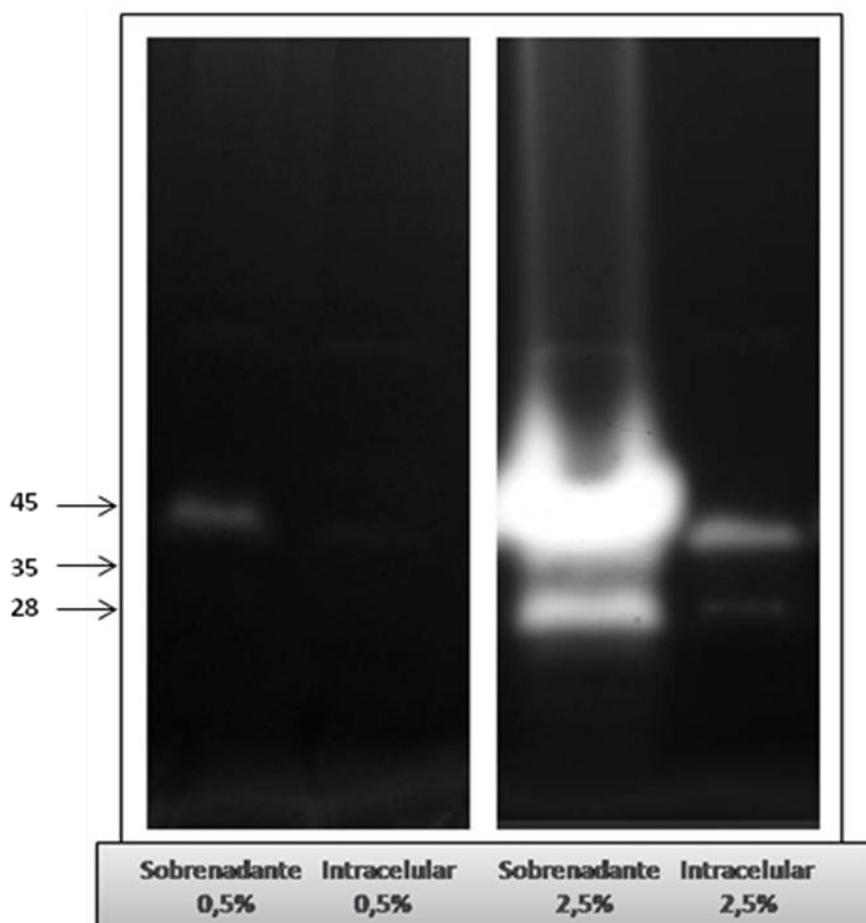


Figura 8: Perfis proteolíticos observados nos sobrenadantes e nos extratos celulares da bactéria *H. blutaparonsis* crescida em LB contendo 0,5 e 2,5% de NaCl. Os géis foram incubados por 24 h em tampão fosfato 10 mM, pH 7,0. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

4 – Caracterização bioquímica parcial das atividades proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis*

4.1 – Efeito do tempo de hidrólise nas atividades proteolíticas

O efeito do tempo de incubação sobre as atividades proteolíticas foi determinado incubando-se os géis de gelatina-SDS-PAGE a 37°C em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,0, durante os períodos de 3, 6, 12 e 24 h. Observou-se um aumento na degradação da gelatina incorporada ao gel ao longo do tempo (Fig. 9). A partir deste resultado, escolhemos como tempo ideal de incubação, para os testes posteriores, o período de 24 h (Fig. 9).

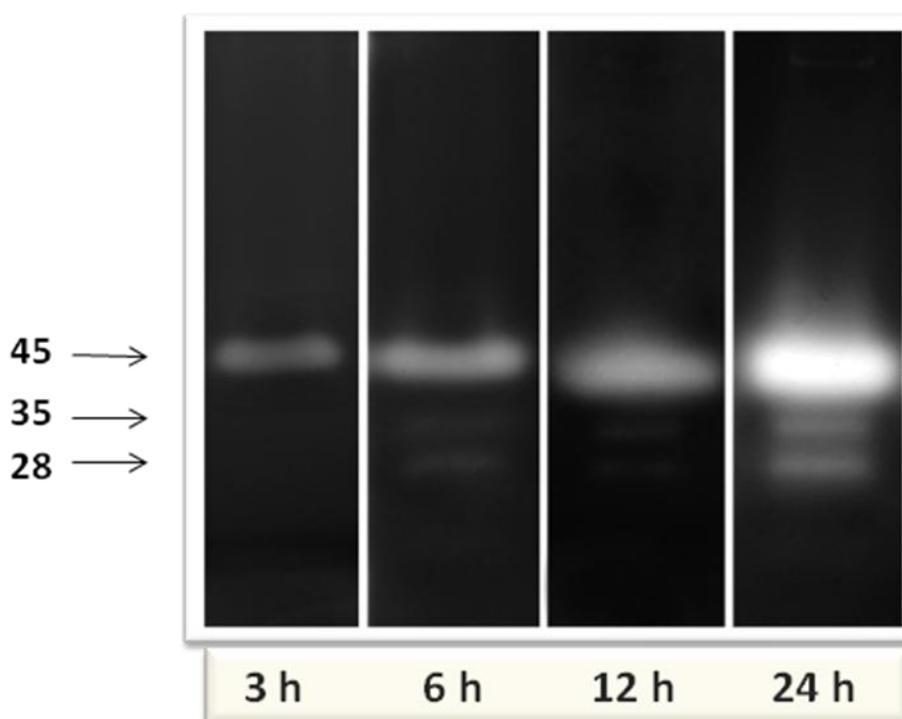


Figura 9: Modulação das atividades proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis* quando incubadas durante diferentes intervalos de tempo (3, 6, 12 e 24 h) a 37°C em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,0. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

4.2 – Efeito do pH nas atividades proteolíticas

O efeito do pH nas atividades proteolíticas foi determinado incubando-se os géis de gelatina-SDS-PAGE a 37°C em sistemas com diferentes tampões de pH (tampão

citrato de sódio 50 mM, pH 3,0; tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0; PBS 10 mM, pH 7,0 e tampão glicina-NaOH 20 mM, pH 9,0 e 11,0). Foi observada atividade proteolítica das três peptidases em uma ampla variação de pH (5,0 a 9,0), com máximo em pH 7,0 (Fig. 10). A atividade hidrolítica correspondente à peptidase de 45 kDa foi a única detectada em valores extremos de pH (3,0 e 11,0) (Fig. 10). Para quantificação das bandas foi realizada a densitometria dos halos proteolíticos nos diferentes valores de pH, considerando-se 100% de atividade o pH 7,0 (Fig. 11). Em pH 5,0, houve uma redução das atividades hidrolíticas de aproximadamente 45% na banda de 45 kDa, 70% na banda de 35 kDa e 20% na banda de 28 kDa. Em pH 3,0, a atividade foi reduzida em mais de 95% na banda de 45 kDa e não se detectou as atividades correspondentes às bandas de 35 e 28 kDa. Em valores de pH superiores ao ideal (pH 7,0), também se observou uma redução gradual na intensidade dos halos de digestão. Em pH 9,0, a redução foi de 45% na banda de 45 kDa, 50% na banda de 35 kDa e 15% na banda de 28 kDa. Já em pH 11,0, foi observada atividade apenas da banda de 45 kDa, com redução de 60% em sua atividade em relação ao pH ótimo (Fig. 11).

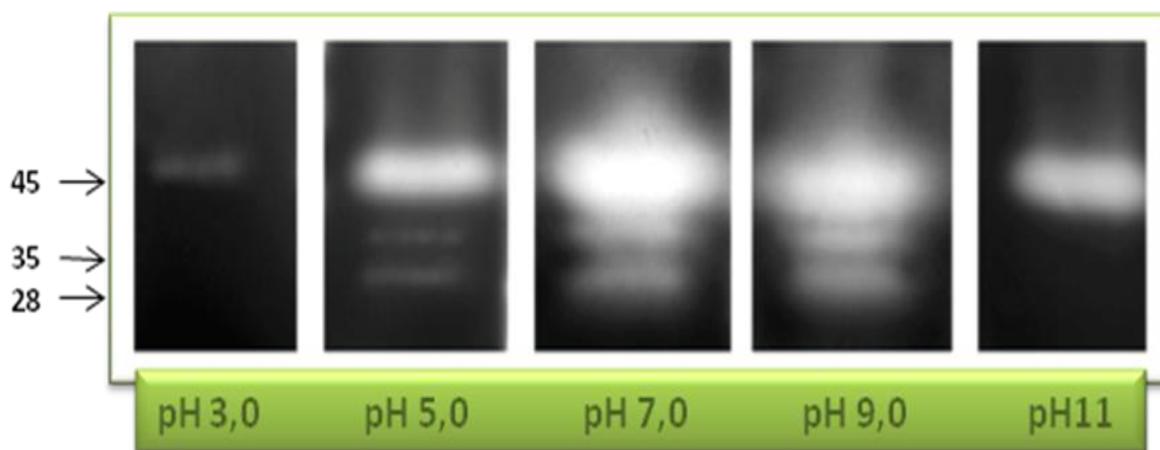


Figura 10: Modulação das atividades proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis* quando incubadas em sistemas com diferentes tampões de pH (tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0; tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0; PBS 10 mM, pH 7,0 e tampão glicina-NaOH 20 mM, pH 9,0 e 11,0). Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

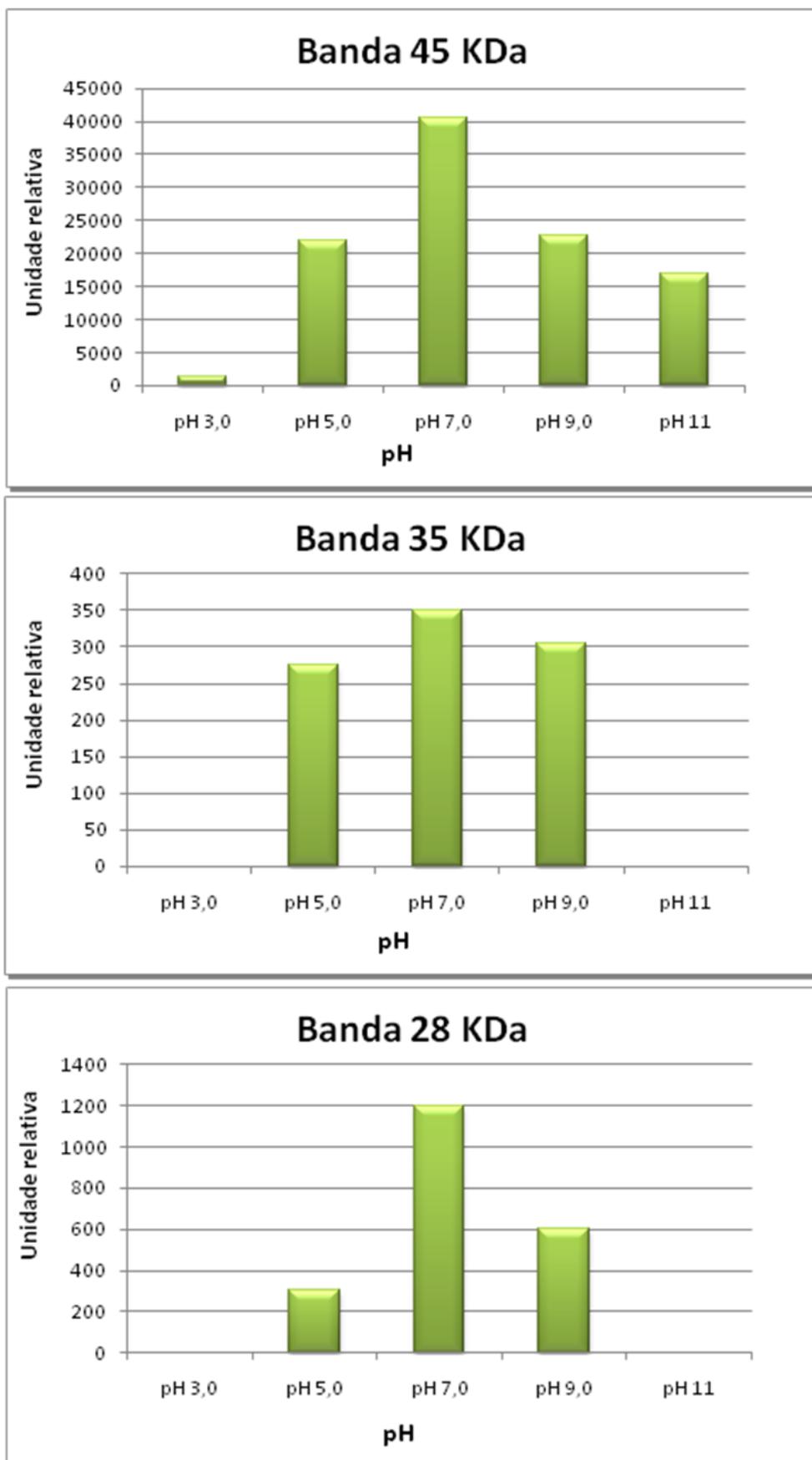


Figura 11: Densitometria dos três halos proteolíticos observados no gel de gelatina-SDS-PAGE quando incubado a 37°C em sistemas com diferentes tampões de pH (tampão citrato de sódio 50 mM, pH 3,0; tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 5,0; PBS 10 mM, pH 7,0 e tampão glicina-NaOH 20 mM, pH 9,0 e 11,0).

4.3 – Efeito da temperatura nas atividades proteolíticas

Para a determinação do efeito da temperatura na atividade proteolítica, foi utilizado o sobrenadante de cultivo crescido em meio LB acrescido de 2,5% de NaCl, que foi identificado previamente como o meio com maior produção de peptidases (Fig. 4). O efeito da temperatura foi evidenciado incubando-se os géis contendo gelatina em diferentes temperaturas (4, 28, 37, 45 e 60°C). As três atividades proteolíticas foram observadas em todas as temperaturas testadas, com exceção a 60°C, na qual apenas a peptidase de 45 kDa foi detectada (Fig. 12). A temperatura ótima destas três peptidases secretadas por *H. blutaparonensis* foi de 37°C (Fig. 12).

Para quantificar a intensidade das bandas sob as diferentes condições de temperatura, foi realizada a densitometria dos halos proteolíticos (Fig. 13). Em temperaturas inferiores a 37°C (temperatura ótima), a atividade decaiu progressivamente nas três bandas proteolíticas analisadas. A 28°C a atividade decaiu em torno de 20% na peptidase de 45 kDa, 40% na peptidase de 35 kDa e 55% na peptidase de 28 kDa. A 4°C a atividade diminuiu em torno de 55% na banda de 45 kDa, 45% na banda de 35 kDa e 75% na banda de 28 kDa. Comportamento parecido foi observado em temperaturas superiores a 37°C: a 45°C houve redução de 60% na atividade da peptidase de 45 kDa, 15% na peptidase de 35 kDa e 35% na peptidase de 28 kDa. Já a 60°C essa redução foi de 75% na banda de 45 kDa, e não foi observada atividade hidrolítica correspondente às peptidases de 35 e 28 kDa (Fig. 13).

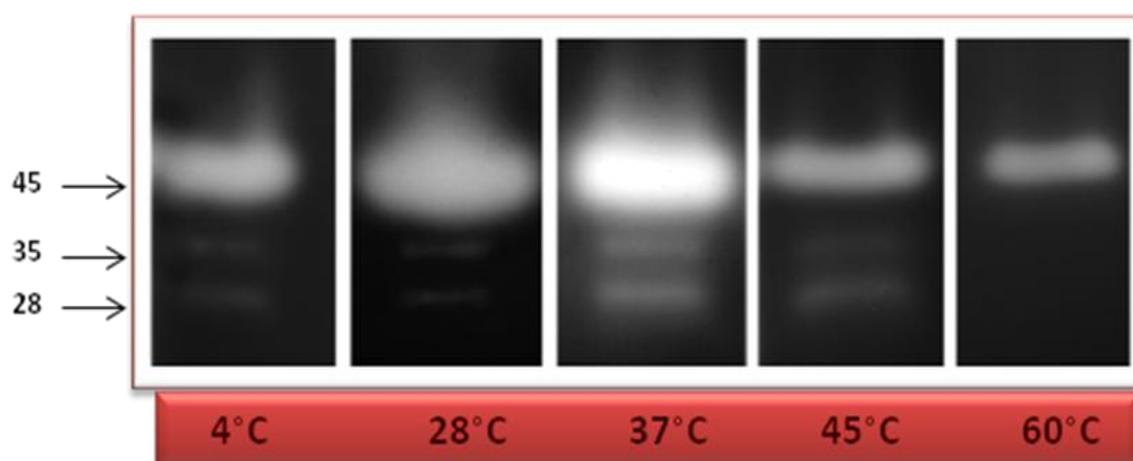


Figura 12: Modulação das atividades proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis* quando incubadas em diferentes temperaturas variando entre 4 e 60°C em tampão PBS 10 mM, pH 7,0. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

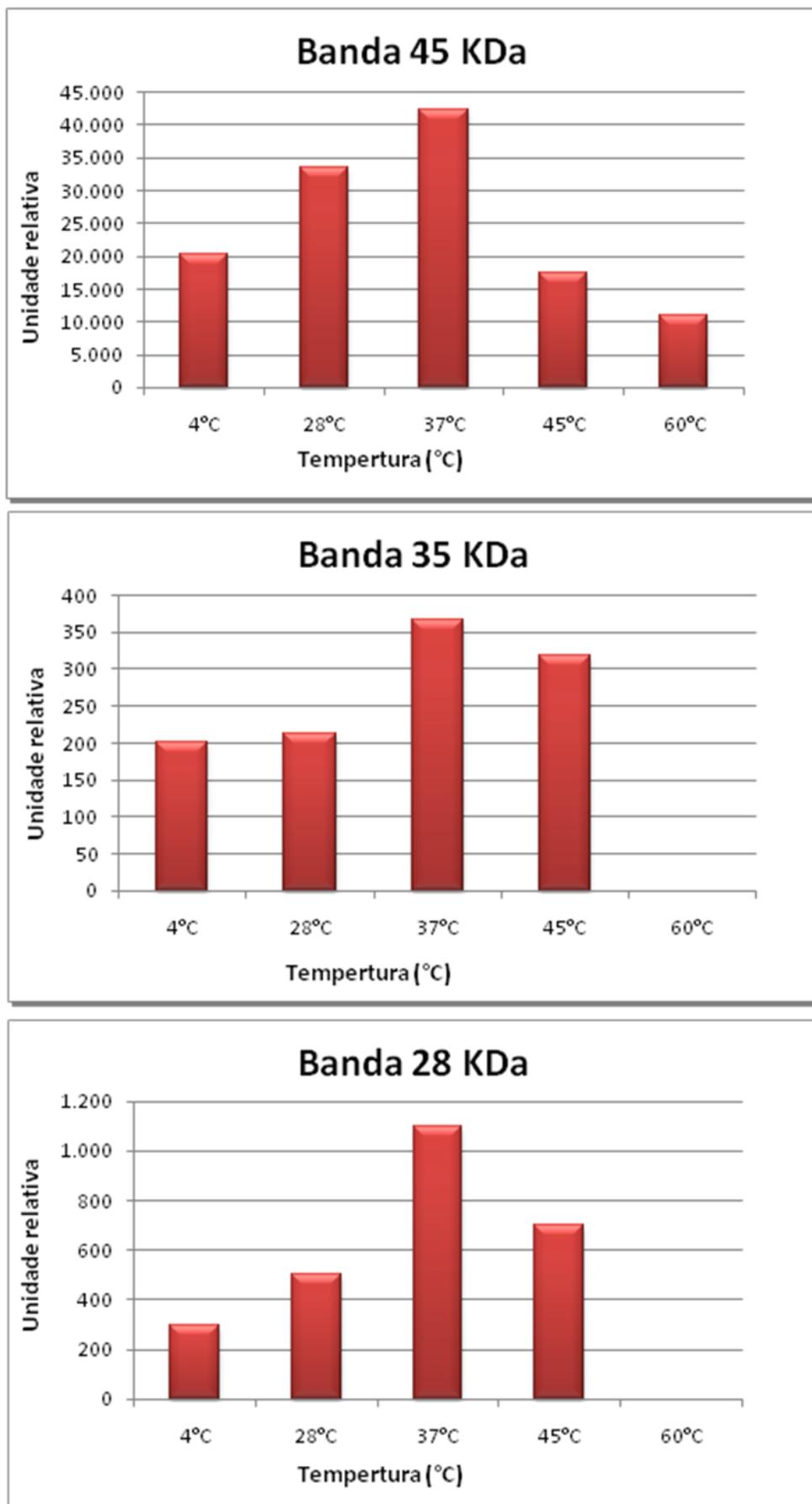


Figura 13: Densitometria dos três halos proteolíticos observados no gel de gelatina-SDS-PAGE quando incubado em diferentes temperaturas variando entre 4 e 60°C em tampão PBS 10 mM, pH 7,0.

4.4 – Efeito de sal nas atividades proteolíticas

O efeito da salinidade na atividade proteolítica foi determinado incubando-se os géis de gelatina-SDS-PAGE a 37°C em PBS, pH 7,0, suplementado com diferentes concentrações de sal (0; 0,5; 2,5; 5,0; 10 e 20% de NaCl). Foi observada atividade proteolítica correspondente às três peptidases secretadas por *H. blutaparonensis* em todas as concentrações de sal testadas (Fig. 14). De uma forma geral, uma notável elevação na atividade proteolítica foi observada de acordo com o aumento da concentração de NaCl (Fig. 14). Para quantificação das bandas, foi realizada a densitometria dos halos proteolíticos nas diferentes concentrações de sal (Fig. 15). A atividade da peptidase de 45 kDa aumentou gradativamente em relação ao aumento da salinidade, com o máximo de atividade na concentração de 5% de NaCl (em torno 50000 Unidades Relativas – UR); no entanto, a partir desta concentração a atividade proteolítica tende a se manter constante (Fig. 15). Quanto à peptidase de 35 kDa, a atividade proteolítica também aumentou em relação à concentração de sal, com a máxima em torno de 1600 UR, quando o gel foi incubado a 10% de NaCl; no entanto, a atividade se reduz para 1150 UR quando na presença de 20% de NaCl. Já para a peptidase de 28 kDa, a atividade proteolítica seguiu um comportamento semelhante às outras peptidases, porém com o máximo de atividade em torno de apenas 1200 UR a 20% de NaCl (Fig. 15).

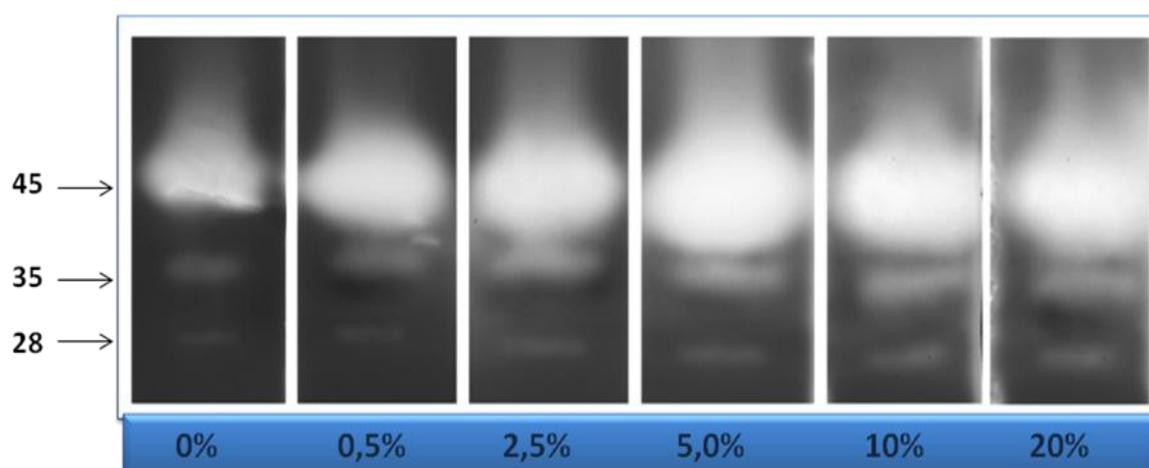


Figura 14: Modulação das atividades proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis* quando incubadas em diferentes concentrações de sal (entre 0 e 20% de NaCl) em tampão PBS 10 mM, pH 7,0. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

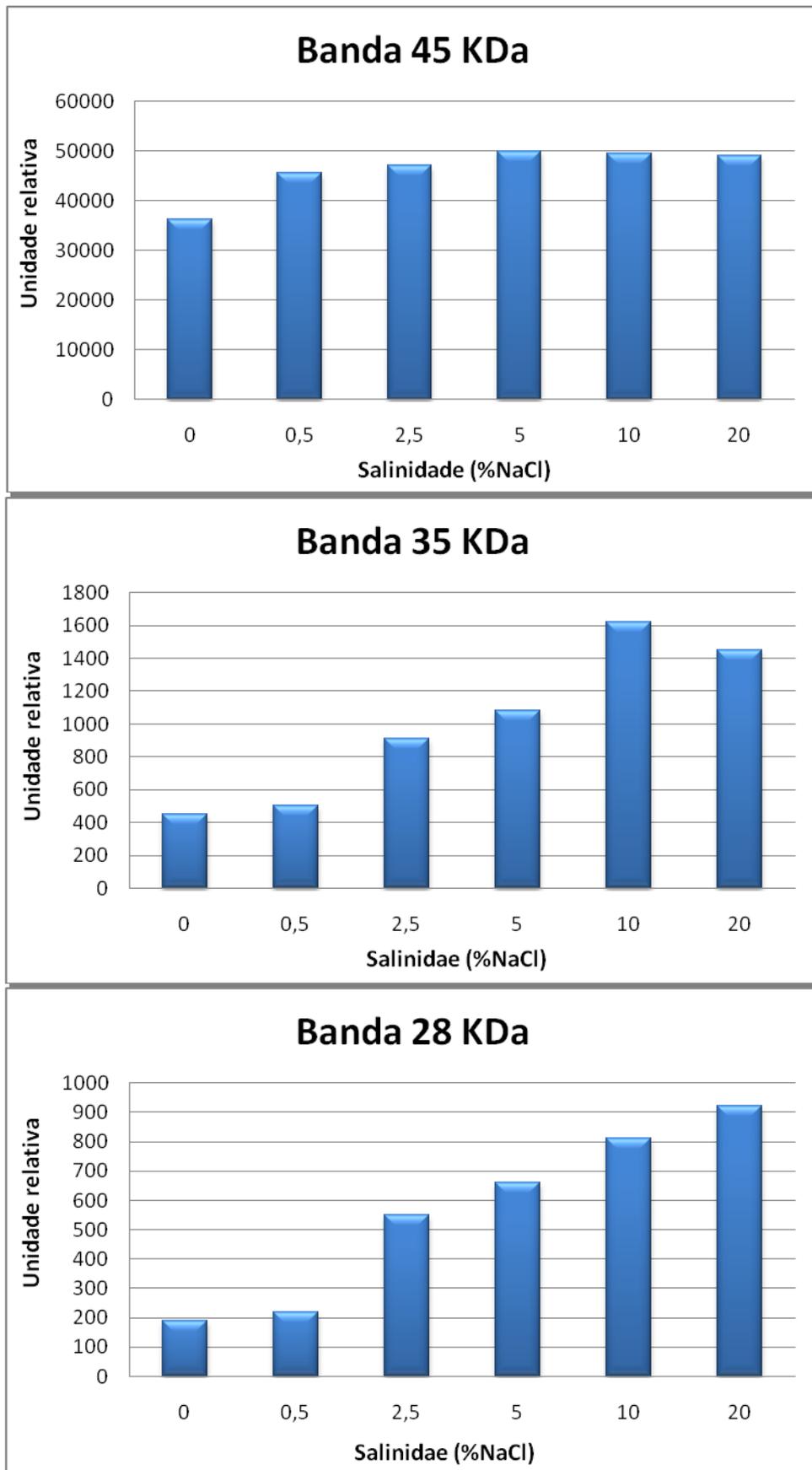


Figura 15: Densitometria dos três halos proteolíticos observados no gel de gelatina-SDS-PAGE quando incubados a 37°C em diferentes concentrações de sal (0; 0,5; 2,5; 5,0; 10 e 20% de NaCl).

4.5 – Efeito de inibidores proteolíticos sobre as atividades enzimáticas

Com o objetivo de caracterizar as peptidases quanto ao grupamento químico presente em seus respectivos centros ativos, suas atividades foram ensaiadas em géis contendo gelatina na presença e na ausência de diferentes inibidores proteolíticos (Fig. 16). Os resultados demonstraram que a peptidase de 35 kDa foi completamente inibida por 1,10-fenantrolina 10 mM, um inibidor clássico de metalopeptidases. Já as enzimas de 45 e 28 kDa foram completamente inibidas por PMSF 10 mM, um inibidor irreversível de serina peptidases. Dois outros inibidores de serina peptidases foram testados, antipaína (10 μ M) e TLCK (100 μ M); no entanto, não foram observadas inibições das atividades enzimáticas em gel. O EDTA (10 mM) foi capaz de inibir parcialmente as atividades dessas enzimas (Fig. 16).

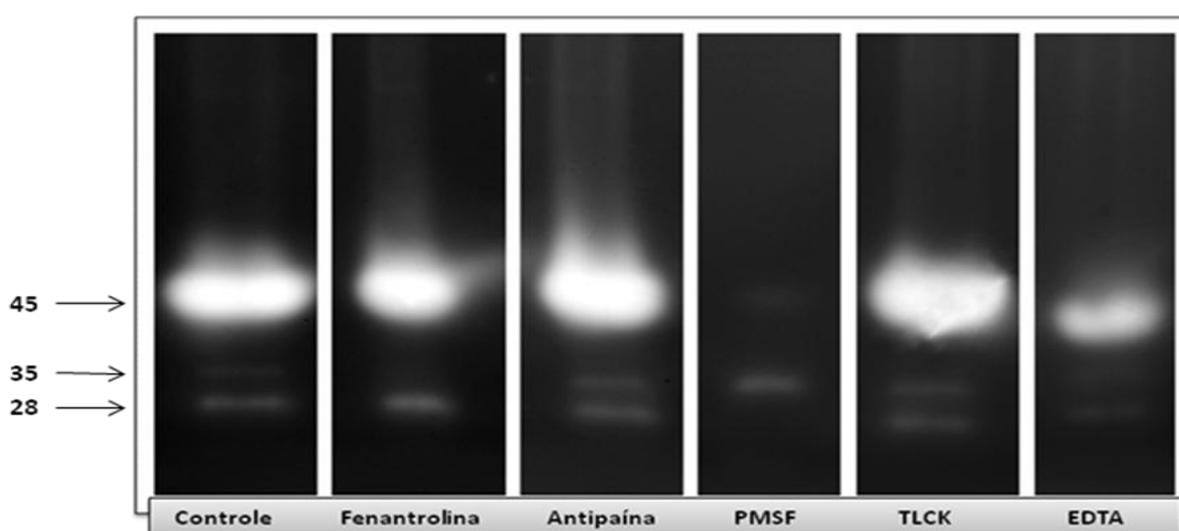


Figura 16: Modulação das atividades proteolíticas extracelulares de *H. blutaparonensis* por inibidores de peptidases. Os géis foram incubados por 24 h, 37°C em tampão PBS 10 mM, pH 7,0, na ausência (controle) e na presença de diferentes inibidores proteolíticos: 1,10-fenantrolina 10 mM, antipaína 10 μ M, PMSF 10 mM, TLCK 100 μ M e EDTA 10 mM. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

5 – Hidrólise de diferentes substratos protéicos pelas peptidases extracelulares

Estes ensaios foram realizados nas condições descritas previamente como ótimas para as atividades enzimáticas, 37°C e pH 7,0. As peptidases secretadas por *H. blutaparonensis* demonstraram capacidades distintas em degradar diferentes substratos protéicos, quando co-polimerizados ao gel (Fig. 17).

As peptidases com massas moleculares de 45, 35 e 28 kDa foram capazes de degradar gelatina e caseína. No caso do BSA, apenas as peptidases com massas moleculares de 45 e 35 kDa demonstraram atividade sobre esta proteína. Porém, quando o substrato co-polimerizado ao gel foi a hemoglobina, apenas a peptidase majoritária de 45 kDa demonstrou capacidade hidrolítica (Fig. 17). Esse resultado sugere que a hemoglobina seria um substrato promissor a ser utilizado para os ensaios de dosagem química, com o objetivo de quantificar particularmente a atividade e estabilidade da peptidase majoritária secretada (uma serina peptidase de 45 kDa) por *H. blutaparonensis*.

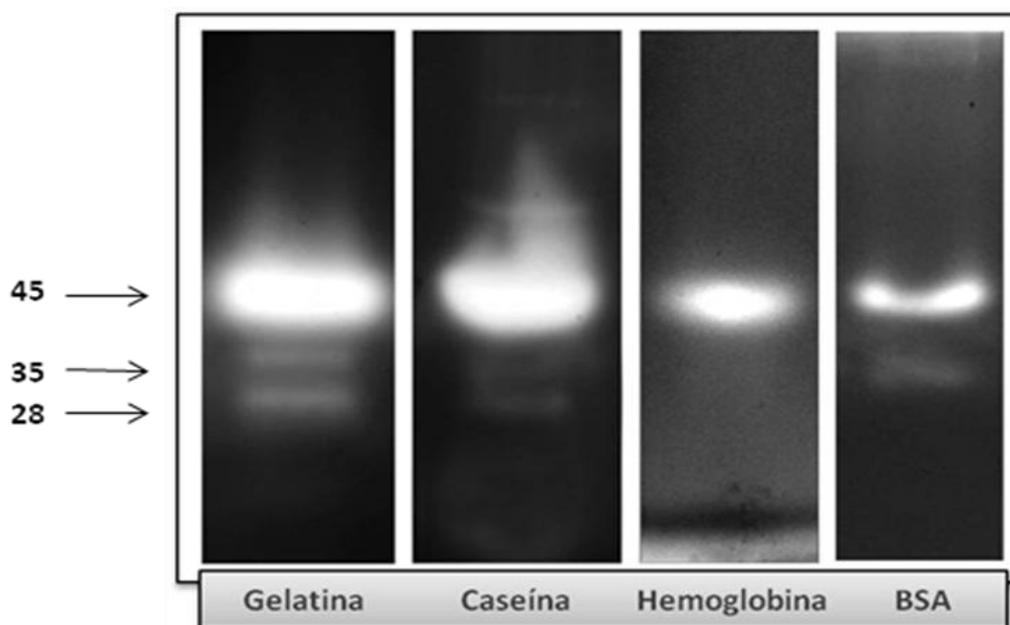


Figura 17: Hidrólise de diferentes substratos co-polimerizados ao gel pelas enzimas proteolíticas secretadas por *H. blutaparonensis*. Os géis foram incubados por 24 h em tampão PBS 10 mM, pH 7,0. Os números à esquerda se referem às massas moleculares das peptidases, expressos em kilodaltons (kDa).

6 – Dosagem química da atividade e estabilidade proteolítica utilizando-se a hemoglobina como substrato

Num passo futuro, pretendemos purificar a principal enzima proteolítica secretada por *H. blutaparonensis*. Para tal, resolvemos iniciar um estudo quantitativo desta atividade enzimática frente a diferentes condições. Para a realização de todos os ensaios de quantificação química de atividade e estabilidade enzimática da peptidase majoritária presente no sobrenadante de cultivo (a serina peptidase de 45 kDa),

selecionou-se a hemoglobina como substrato ideal, pois foi o substrato protéico degradado apenas por esta peptidase.

6.1 – Efeito do tempo de incubação sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

Com o intuito de estabelecer o melhor tempo de incubação para os ensaios de dosagem proteolítica, o sobrenadante de *H. blutaparonensis* foi incubado com o substrato protéico (hemoglobina) em diferentes intervalos de tempo (0; 0,15; 0,30; 0,45; 1; 3; 6 e 24 h). A partir de 30 min de incubação, foi observada atividade proteolítica em torno de 1000 Unidades Arbitrárias (UA)/mg de proteína (Fig. 18). A atividade proteolítica foi aumentando gradativamente em relação ao tempo de incubação com o substrato. Após 1 h, a atividade foi de aproximadamente 1360 UA/mg, após 3 h de 1440 UA/mg e após 6 h de 2160 UA/mg. O máximo de atividade enzimática ocorreu após 24 h de incubação da enzima com o respectivo substrato. Por isso, o tempo de 24 h foi protocolado como ideal para todas as dosagens utilizadas em testes posteriores de caracterização da atividade e estabilidade proteolítica (Fig. 18).

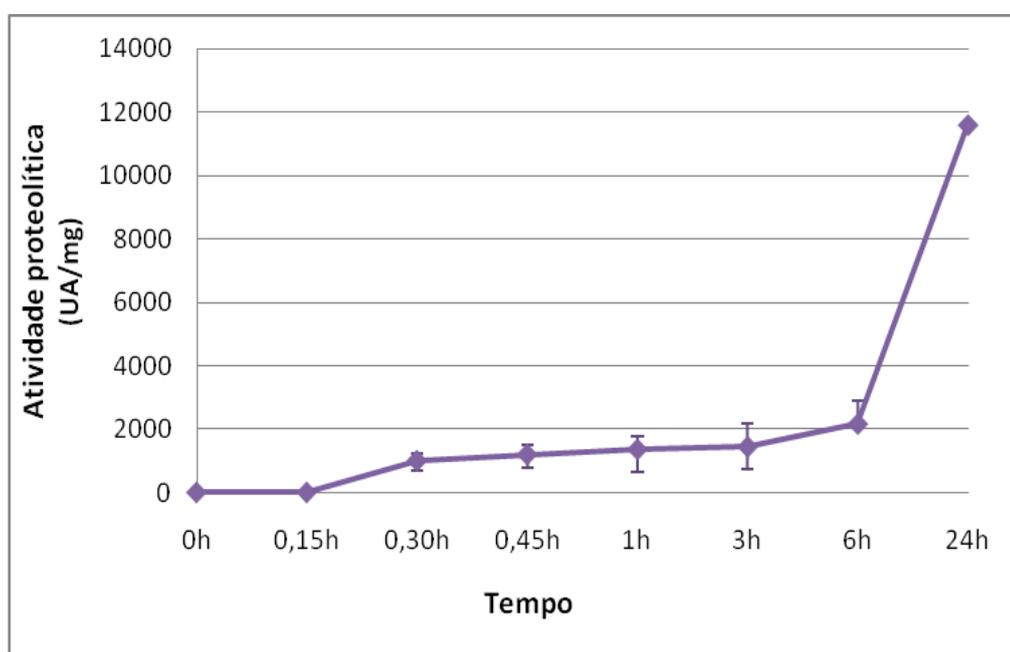


Figura 18: Efeito de diferentes tempos de incubação (0; 0,15; 0,30; 0,45; 1; 3; 6 e 24 h) com hemoglobina sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados a 37°C, pH 7,0. Atividade proteolítica foi expressa como unidade arbitrária (UA)/mg de proteína.

6.2 – Efeito da temperatura sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

Com o objetivo de quantificar a influência da temperatura na atividade proteolítica, o sobrenadante de *H. blutaparonensis* foi incubado com a hemoglobina sob diferentes temperaturas (4, 28, 37, 45 e 60°C). Foi observada atividade proteolítica em todas as temperaturas testadas, com o ótimo de atividade a 37°C (Fig. 19).

Em temperaturas inferiores a 37°C (temperatura ótima), a atividade caiu de forma abrupta, correspondendo a 20% da atividade máxima quando incubada a 28°C e não ocorrendo atividade detectável a 4°C. O mesmo efeito foi observado em temperaturas superiores a 37°C, porém, de forma um pouco menos abrupta, onde mais de 30% da atividade máxima foi mantida a 45°C e mais de 25% a 60°C (Fig. 19).

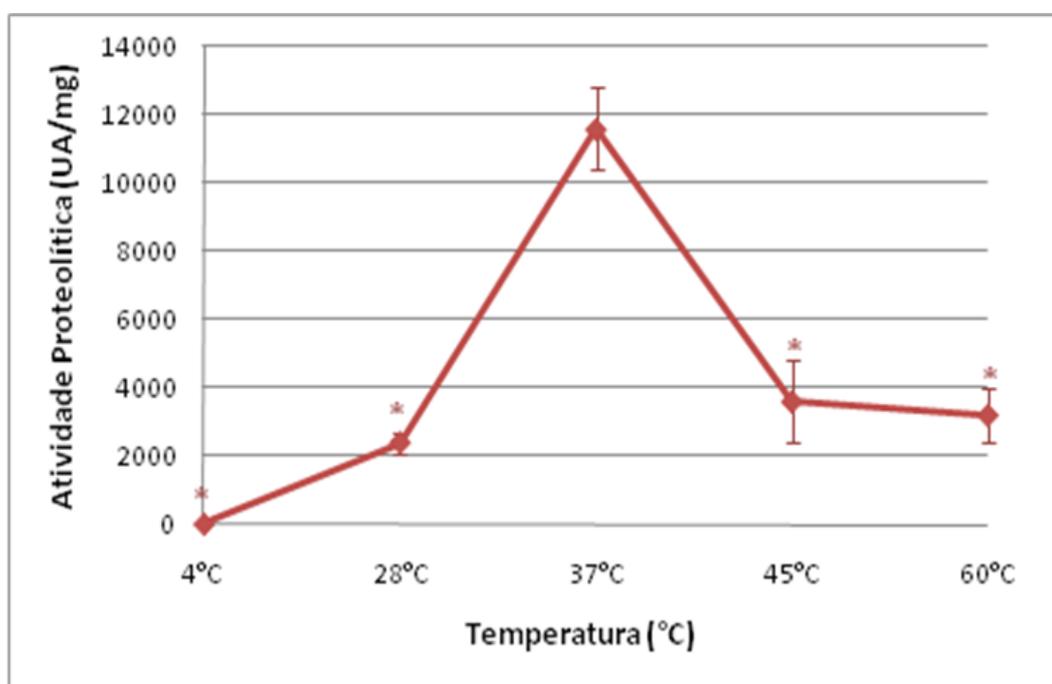


Figura 19: Efeito de diferentes temperaturas (4, 28, 37, 45, 60°C) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados em pH 7,0. Atividade proteolítica foi expressa como (UA)/mg de proteína. Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

6.3 – Efeito do pH sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

Para estudar o efeito do pH sobre a atividade proteolítica majoritária de *H. blutaparonensis*, o sobrenadante de cultivo foi incubado com a hemoglobina em diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0). Foi observada atividade proteolítica em uma ampla variação de pH (3,0 a 9,0), com o máximo em pH 7,0 (Fig. 20).

Em pH 3,0, a enzima manteve 50% de sua atividade proteolítica (5600 UA/mg), quando comparada ao ótimo de atividade (pH 7,0). Em pH 5,0, esse percentual de atividade subiu para 82% (9600 UA/mg). Já a atividade enzimática em pH 9,0 se manteve em 86% (10000 UA/mg) (Fig. 20).

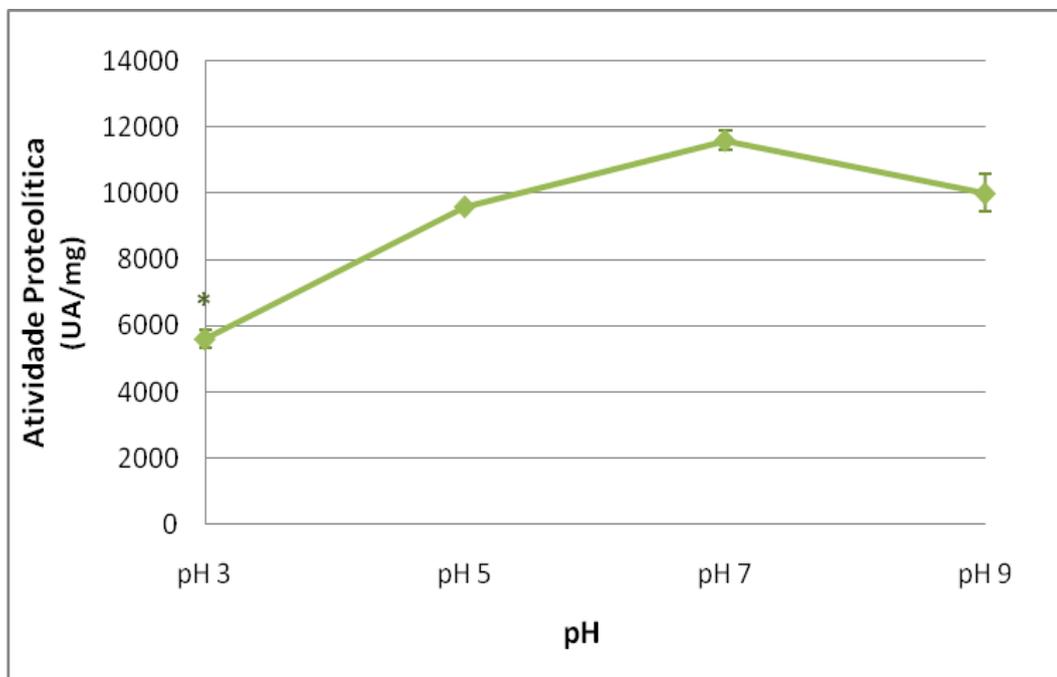


Figura 20: Efeito de diferentes valores de pH (3,0, 5,0, 7,0 e 9,0) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados a 37°C. Atividade proteolítica foi expressa como (UA)/mg de proteína. Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

6.4 – Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

Com a finalidade de analisar a influência do sal na atividade proteolítica, a dosagem química foi realizada na presença de distintas concentrações de NaCl (0,5; 2,5; 5,0; 10 e 20%). Observou-se atividade proteolítica numa faixa de salinidade que variou de 0,5% a 5% de NaCl. Porém, o sal parece influenciar negativamente a atividade enzimática (Fig. 21). Os dados obtidos nesse ensaio parecem conflitar com os resultados dos géis; isso pode ter ocorrido devido à influência de elevadas concentrações de sal na conformação de substratos protéicos normalmente utilizados para dosagens químicas.

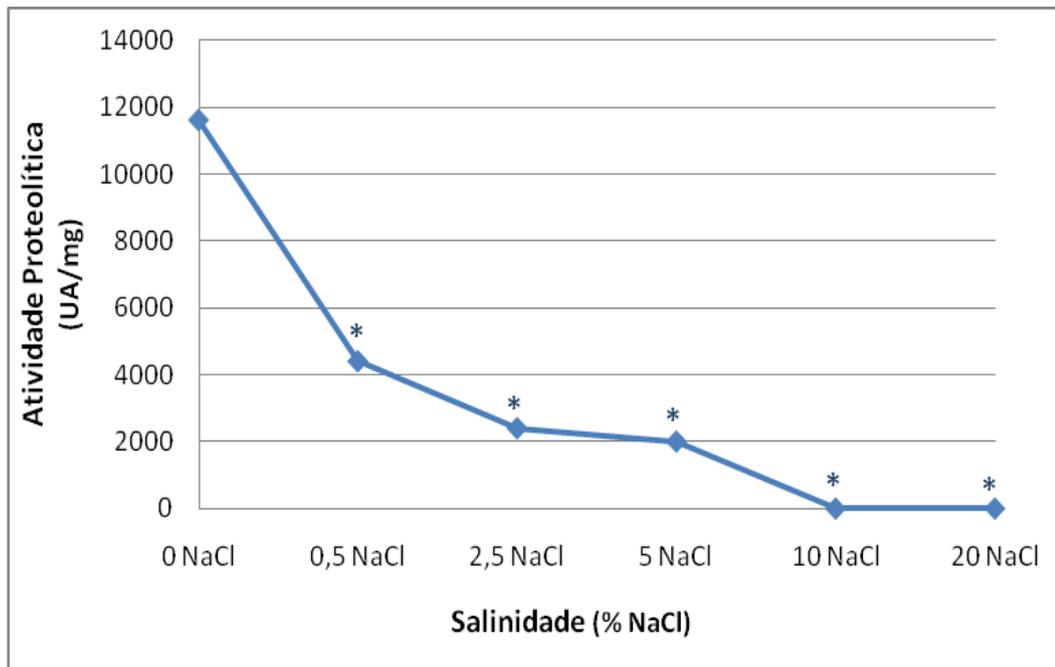


Figura 21: Efeito de diferentes concentrações de NaCl (0; 0,5; 2,5; 5,0; 10 e 20% de NaCl) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados a 37°C, pH 7,0. Atividade proteolítica foi expressa como (UA)/mg de proteína. Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

6.5 – Efeito de inibidores proteolíticos sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

Com a intenção de quantificar o efeito dos inibidores proteolíticos sobre a atividade enzimática majoritária secretada por *H. blutaparonensis*, realizou-se a dosagem química na ausência e na presença de diferentes inibidores proteolíticos. Os resultados mostram que o PMSF foi capaz de inibir por completo a atividade enzimática, enquanto os outros inibidores de serina peptidase (antipaína e TLCK) inibiram aproximadamente 90% dessa atividade. O EDTA causou redução de 50% na atividade e a 1,10-fenantrolina proporcionou um aumento de 15% na atividade da enzima em questão (Fig. 22).

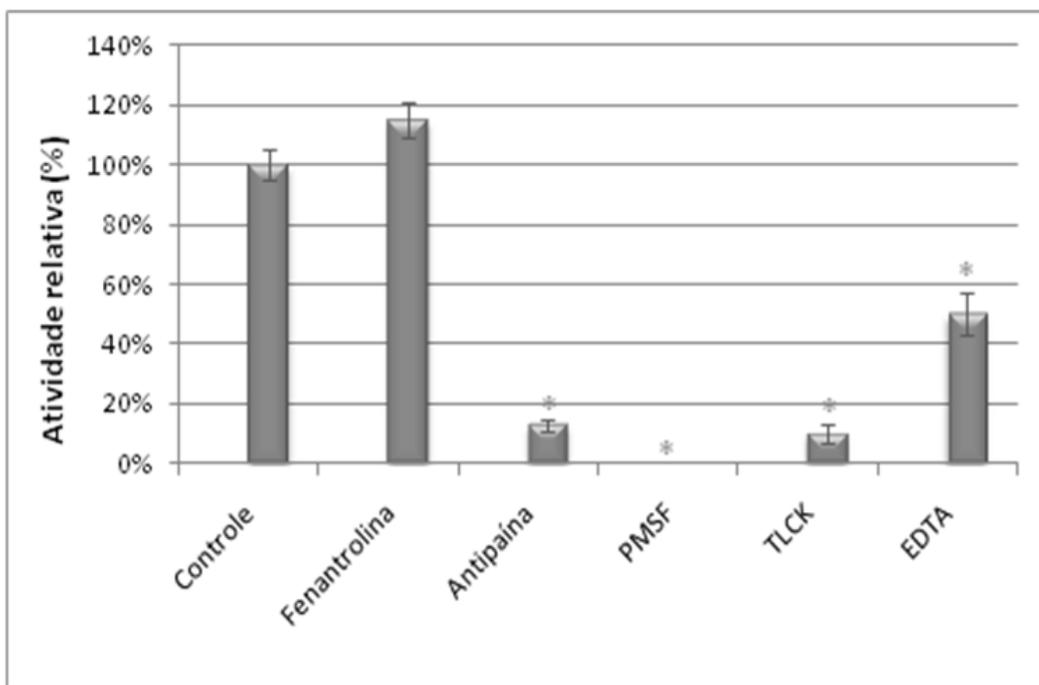


Figura 22: Efeito de diferentes inibidores proteolíticos (1,10-fenantrolina 10 mM, antipaína 10 μ M, PMSF 10 mM, TLCK 100 μ M e EDTA 10 mM) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados a 37°C, pH 7,0. A atividade relativa foi definida como a porcentagem de atividade detectada em relação ao máximo da atividade proteolítica (sistema sem adição de nenhum inibidor proteolítico – controle). Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

6.6 – Efeito de íons metálicos sobre a atividade catalítica da peptidase de 45 kDa

A partir dos resultados com os inibidores, nos quais inibidores de metalopeptidases, conhecidos agentes quelantes, modularam positiva e negativamente a atividade da serina peptidase majoritária secretada por *H. blutaparonensis*, resolvemos analisar o efeito de íons divalentes sobre a atividade desta peptidase. Neste sentido, testamos o efeito de diferentes íons metálicos (inicialmente na concentração de 10 mM) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. A atividade proteolítica foi totalmente inibida por Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} e parcialmente inibida por Co^{2+} . Os demais íons metálicos testados (Ca^{2+} , Mn^{2+} e Mg^{2+}) não apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática (Fig. 23).

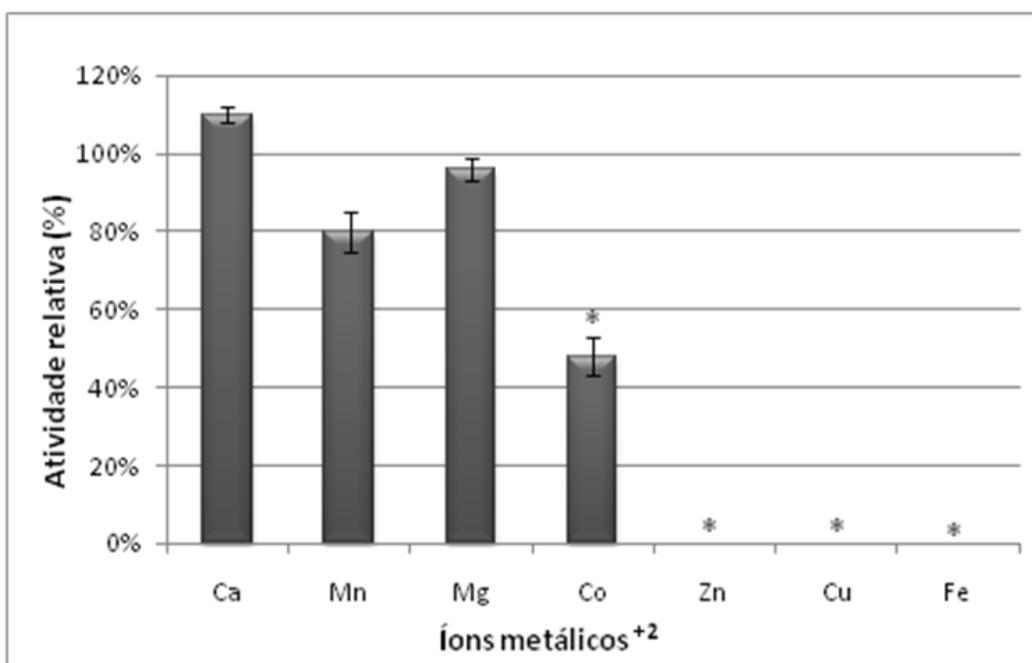


Figura 23: Efeito dos íons metálicos na atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. O sobrenadante foi incubado na ausência e na presença de diferentes íons metálicos a 10 mM: Ca^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+} . Os ensaios foram realizados a 37°C, pH 7,0. A atividade relativa foi definida como a porcentagem de atividade detectada em relação ao máximo da atividade proteolítica (sem adição de nenhum íon metálico – controle). Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

Os íons metálicos que inibiram totalmente (Cu^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{2+}) e parcialmente (Co^{2+}) a atividade proteolítica foram testados em concentrações menores, com o objetivo de identificar a partir de qual concentração mínima havia inibição significativa da atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. A atividade proteolítica foi totalmente inibida por Cu^{2+} e Fe^{2+} a partir da concentração de 1 mM. O íon zinco inibe totalmente a atividade proteolítica apenas na concentração de 10 mM. Já o íon metálico Co^{2+} inibiu apenas de forma parcial, mesmo na concentração de 10 mM.

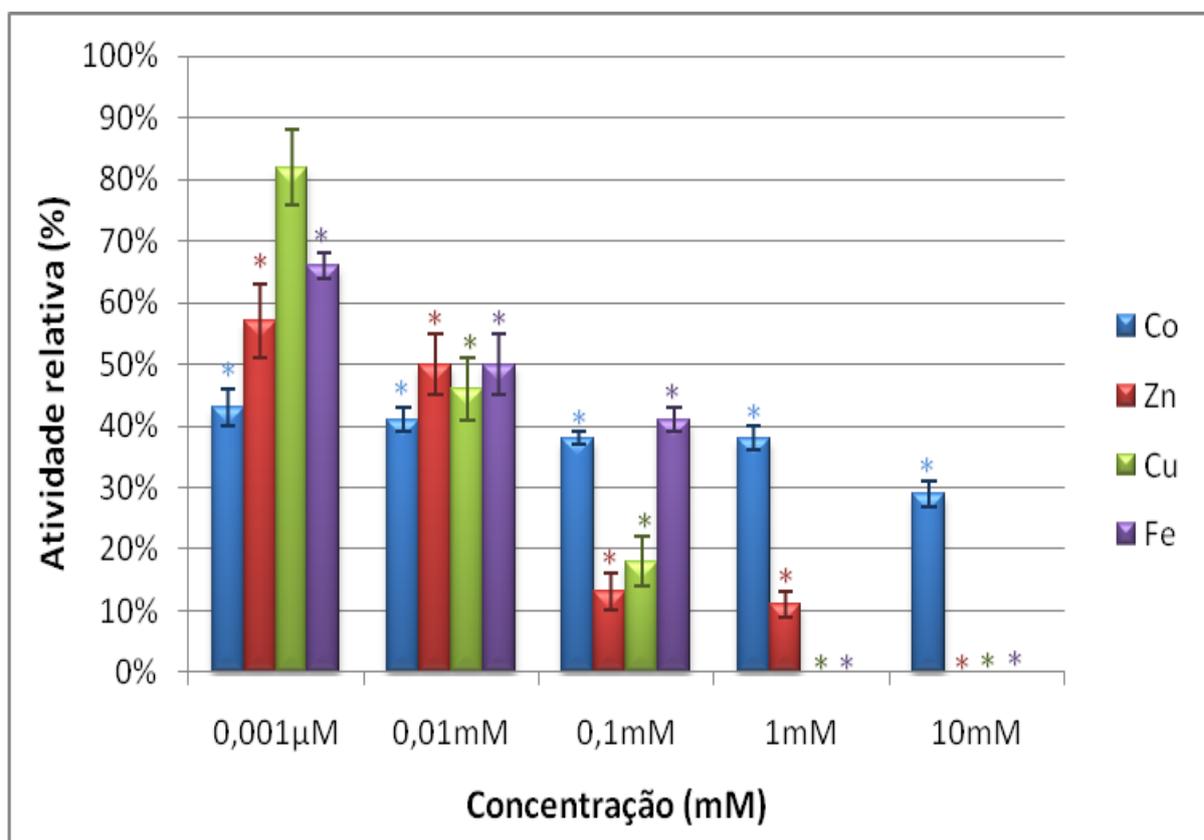


Figura 24: Efeito de diferentes concentrações dos íons metálicos (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} e Co^{2+}) sobre a atividade proteolítica majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. O sobrenadante foi incubado na ausência e na presença de diferentes concentrações dos íons a 37°C, pH 7,0. A atividade relativa foi definida como a porcentagem de atividade detectada em relação ao máximo da atividade proteolítica (sem adição de nenhum íon metálico – controle). Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

7 – Termoestabilidade

Para o estudo da termoestabilidade, o sobrenadante de *H. blutaparonensis* foi previamente incubado por 15 e 30 min em diferentes temperaturas (37, 45, 60 e 80°C). Após estes períodos de tempo, as dosagens químicas da atividade enzimática foram realizadas. Este estudo demonstrou que a peptidase majoritária manteve atividade proteolítica após 30 min de incubação nas diferentes temperaturas, ocorrendo perda de atividade gradual à medida que se observava a elevação na temperatura. A 37°C, a atividade proteolítica se manteve estável, havendo redução de menos de 10% na sua atividade. Quando incubada a 45°C, a enzima ainda manteve 60% de sua atividade. A 60°C, a atividade decaiu para 40%. Já a 80°C, a enzima apresentou apenas 10% de atividade residual (Fig. 25). No entanto, a incubação por 15 min, nestas diferentes

temperaturas, não promoveu redução significativa da atividade, com exceção da incubação a 80°C, que reduziu a atividade em aproximadamente 65% (Fig. 25).

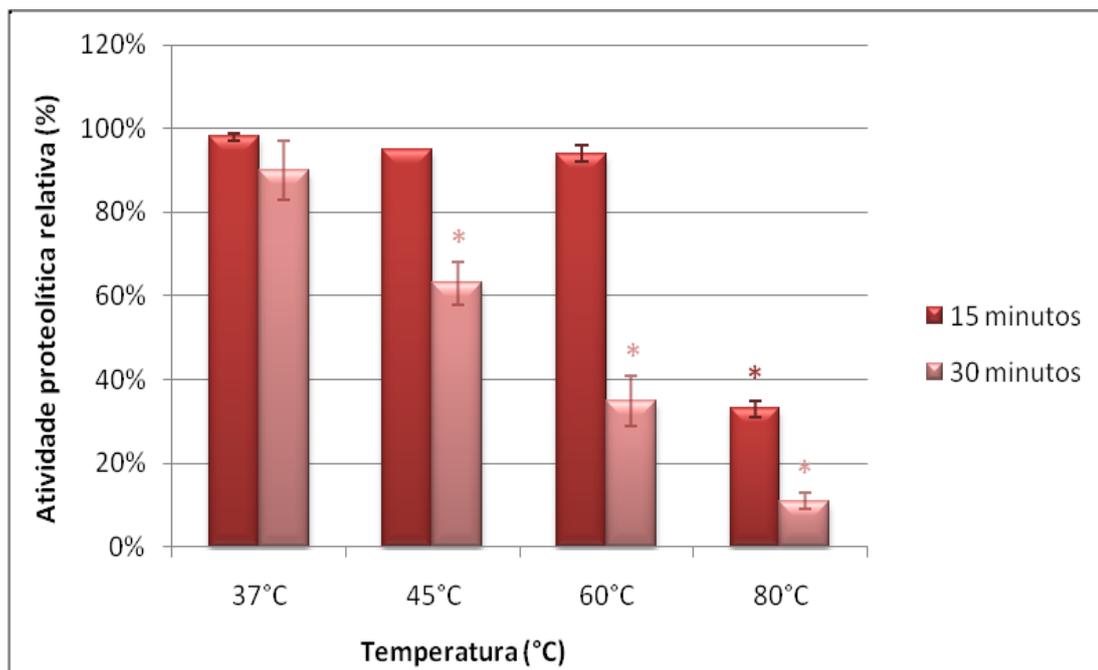


Figura 25: Termoestabilidade da peptidase majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados em pH 7,0. A atividade relativa foi definida como a porcentagem de atividade detectada em relação ao máximo da atividade proteolítica. Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

8 – Estabilidade ao pH

A estabilidade ao pH foi avaliada incubando-se o sobrenadante de *H. blutaparonensis* em soluções contendo diferentes valores de pH (3,0; 5,0; 7,0 e 9,0) por 15 e 30 min. Os resultados mostraram que houve manutenção da estabilidade enzimática entre os valores de pH 5,0 e 9,0 (Fig. 26). Não foi mensurada atividade proteolítica quando o sobrenadante foi pré-incubado por 30 min em pH 3,0 e apenas 40% da atividade hidrolítica foi mensurada após 15 min de incubação neste pH (Fig. 26).

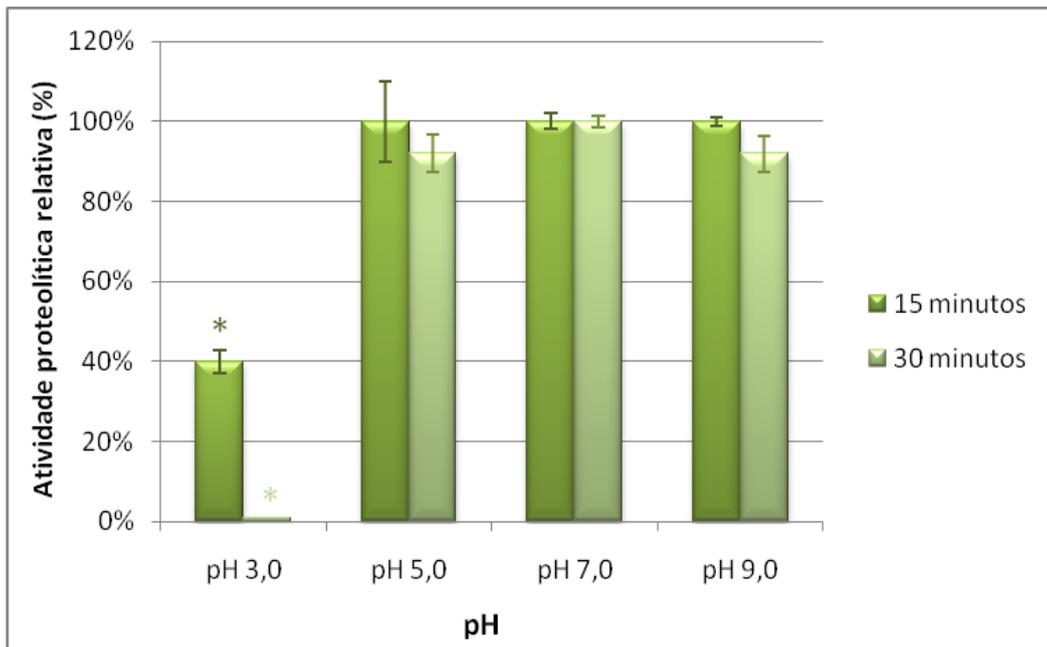


Figura 26: Estabilidade ao pH da peptidase majoritária secretada por *H. blutaparonensis*. Os ensaios foram realizados a 37°C. A atividade relativa foi definida como a porcentagem de atividade detectada em relação ao máximo da atividade proteolítica. Os sistemas assinalados com o símbolo * apresentaram alterações significativas.

DISCUSSÃO

A nova espécie de bactéria denominada *H. blutaparonensis*, isolada da raiz da planta *B. portulacoides* na Restinga de Jurubatiba, foi capaz de crescer em meio LB contendo uma ampla variação de concentração de sal. Esse comportamento analisado ocorre, provavelmente, em virtude das condições às quais um ambiente de restinga é submetido. A espécie de planta *B. portulacoides* possui formação rastejante e é amplamente encontrada na beira das praias dessa restinga, por isso sofre influência diária da variação da maré. Por estarem submetidas a esse tipo de ambiente, as raízes dessa planta acumulam sal, tornando-se um recinto propício ao crescimento de microrganismos capazes de sobreviver em ambientes com ampla variação de salinidade.

Na construção das curvas de crescimento, em meio LB com diferentes concentrações de sal (0,5%, 2,5%, 5,0% e 10% de NaCl), foi possível visualizar comportamentos distintos quando a bactéria foi submetida a essas diferentes condições. Houve crescimento celular nas quatro condições diferentes de sal avaliadas neste trabalho. Os resultados indicaram ainda que em meio contendo acréscimo de 2,5% de NaCl, o crescimento celular foi mais proeminente, cerca de 10 vezes maior que nas outras condições de cultivo. Esses resultados sugeriram que a melhor condição de crescimento para avaliar a produção de peptidases por essa nova espécie bacteriana seria em meio LB contendo NaCl 2,5%.

As análises qualitativas das peptidases secretadas por essa nova espécie bacteriana foram realizadas através de gelatina-SDS-PAGE. Essa é uma técnica de eletroforese contendo substrato protéico, amplamente utilizada para a obtenção de zimogramas complexos de enzimas proteolíticas (HEUSSEN & DOWDLE, 1980). Os resultados demonstraram que não havia diferença entre os perfis proteolíticos das amostras intracelulares (células lisadas) e extracelulares (sobrenadante), sendo detectadas três bandas migrando em aproximadamente 45, 35 e 28 kDa. Contudo, a atividade proteolítica observada no gel foi muito mais intensa no sobrenadante quando comparada com a atividade do lisado celular, o que demonstra que essa estirpe bacteriana secreta seu repertório enzimático em grande quantidade. Essa é uma característica primária para a inclusão dessa nova espécie em estudos posteriores envolvendo aplicações biotecnológicas.

A estabilidade das proteínas tem sido uma questão chave em grande parte das aplicações industriais e farmacêuticas. Nos últimos anos, vêm aumentando os esforços relativos à busca e ao desenvolvimento de proteínas altamente estáveis, que possam manter seu desempenho sob as condições adversas às quais são submetidas nos processos industriais. Extremófilos são microrganismos capazes de sobreviver em ambientes extremos e constituem uma fonte em potencial de enzimas estáveis (D'AMICO *et al.*, 2003). A temperatura é o mais importante dos fatores ambientais que controlam as atividades e a evolução desses microrganismos, e, provavelmente, a variável de maior importância nas reações químicas (WARD & MOO-YOUNG, 1998).

Em gel de gelatina-SDS-PAGE, as peptidases da espécie *H. blutaparonensis* apresentaram atividade em diferentes temperaturas (4°C, 28°C, 45°C e 60°C), com o ótimo em torno de 37°C. Já no ensaio de dosagem química, foi utilizada a hemoglobina como substrato protéico com intuito de mensurar apenas a atividade hidrolítica da peptidase majoritária de 45 kDa, pois somente esta peptidase demonstrou atividade contra este substrato. Neste ensaio, a enzima apresentou temperatura ótima de atividade em torno de 37°C, não demonstrou atividade em baixa temperatura (4°C) e apresentou uma atividade que variou entre 3000 a 4000 UA/mg quando submetida a temperaturas elevadas de 45 e 60°C, respectivamente. Nos testes de termoestabilidade, esta peptidase se demonstrou estável quando submetida por 15 min a altas temperaturas, o que é interessante, já que peptidases termoestáveis são preferenciais para a aplicação em processos biotecnológicos (SMALAS *et al.*, 2000) Nas condições de uma lavanderia industrial, onde as peptidases alcalinas são geralmente utilizadas por 10 min a 60°C, a termoestabilidade moderada dessa peptidase majoritária de *H. blutaparonensis* poderia ser vantajosa.

As peptidases secretadas por *H. blutaparonensis* demonstraram atividade numa ampla variação de pH (3,0 – 11,0), com pH ótimo em torno de 7,0. Nos ensaios de dosagem química com hemoglobina, a peptidase majoritária de 45 kDa também apresentou atividade tanto em pH ácido como em pH básico, com o ótimo em torno do neutro, confirmando, assim, dados da literatura que relatam várias peptidases extracelulares de halofílicos com atividade máxima em pH próximo à neutralidade. Essa enzima demonstrou também uma boa estabilidade quando submetida a variações de pH, exceto quando a variação foi para um pH mais ácido (pH 3,0).

Sabe-se que as haloarchaeas estão entre os principais extremófilos conhecidos por secretar peptidases que atuam em elevadas concentrações de sal (LANYI, 1974). Enzimas produzidas por microrganismos halofílicos, em especial esse grupo de

archaeas, desenvolveram mecanismos específicos para a manutenção da solubilidade em elevadas concentrações de sal. Essas enzimas passaram a possuir uma alta carga negativa fornecida por grupos carboxílicos recobertos por elevada concentração de sal, com a finalidade de manter a estabilidade proteica. Por isso, esse seleto grupo de microrganismos acumula alta concentração de KCl no citoplasma para suportar o estresse osmótico e manter a conformação de suas proteínas. Por outro lado, bactérias halofílicas acumulam solutos orgânicos compatíveis para a manutenção da estrutura de suas proteínas. Ou seja, o repertório proteico desse grupo de microrganismos não depende de sal para a manutenção de sua atividade e estabilidade. Por isso, conseguem sobreviver tanto em ambiente com elevada concentração de sal como em ambientes sem sal, e esse comportamento se reflete no desempenho do perfil enzimático dessas bactérias (GIMENES *et al.*, 2000; VIDYASAGAR *et al.*, 2006).

Nos ensaios de gelatina-SDS-PAGE com diferentes concentrações de NaCl, as peptidases produzidas por *H. blutaparonensis* demonstraram um aumento gradual na atividade enzimática concomitantemente com a elevação na concentração de sal. Porém, nos ensaios de dosagem química que utilizaram hemoglobina como substrato proteico, esse desempenho parece ter sido antagônico, ou seja, quanto maior a concentração de sal menor foi a atividade proteolítica mensurada. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de que alguns substratos protéicos, incluindo a hemoglobina, perderem a sua conformação original em altas concentrações de sal (CAPIRALLA *et al.*, 2002). Como as peptidases demonstraram atividade em elevadas concentrações de NaCl, estas se apresentam como fortes candidatas a serem utilizadas em fermentação de molho de peixe, um tempero popular do Sudeste Asiático, que é produzido a partir da fermentação da mistura de peixes em condições de elevadas concentrações de sal (MCIVER, BROOKS & REINECCIUS, 1982). O líquido dessa fermentação é rico em proteínas solúveis de peixe, peptídeos e aminoácidos que dão o gosto característico do molho (PARK *et al.*, 2002; CURTIS, 2009). Eles são produzidos durante a degradação proteolítica por peptidases endógenas de músculos ou trato digestivo dos peixes, e por vários microrganismos presentes nesse caldo de fermentação (TAIRA *et al.*, 2007; YONGSAWATDIGUL, RODTONG & RAKSAKULTHAI, 2007). Devido a isso, as peptidases halotolerantes microbianas são consideradas um importante contribuinte para a obtenção do molho de peixe na indústria alimentícia. No entanto, é importante enfatizar que nos ensaios de influência da salinidade na atividade enzimática, as peptidases produzidas por essa nova espécie de bactéria halofílica apresentaram excelente atividade mesmo em

condições de completa ausência de NaCl, diferentemente do que já foi relatado na literatura sobre peptidases produzidas por archaeas halofílicas, as quais, apesar de possuírem excelente termoestabilidade, necessitam de altas concentrações de NaCl para que possam apresentar alguma atividade proteolítica (VIDYASAGAR *et al.*, 2006).

Por isso, esses resultados nos levam para o conceito de que esta nova espécie de bactéria halofílica não utiliza sais para a manutenção de sua osmolaridade, e que, talvez, utilize solutos orgânicos compatíveis, como já foi previamente relatado na literatura (GIMENES *et al.*, 2000; VIDYASAGAR *et al.*, 2006). Porém, estudos futuros mais aprofundados sobre a real influência dos solutos orgânicos na atividade dessas peptidases ainda precisam ser elaborados. Esta não-dependência de NaCl pode aumentar a aplicabilidade dessas enzimas em biotecnologia e na indústria, que, de certa forma, se acha limitada pela necessidade de elevadas concentrações de sal (AKOLKAR *et al.*, 2008).

MITRA (2001) relatou que os mecanismos de resistência à seca, em plantas, podem ser agrupados em três categorias: fuga da seca, evitar a seca e tolerância à seca. O mecanismo de tolerância à seca, desencadeado por estresse osmótico provocado por alta salinidade, é, conseqüentemente, uma complexa via que ainda precisa ser elucidada, uma vez que as expressões de diversos genes dependem da ação e da interação de caracteres diferentes, tais como: morfológicos (área reduzida da folha, murcha da folha, índice de cera, sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, elevado e eficiente uso de água, o fechamento estomático e ajuste osmótico) e bioquímicos (acúmulo de solutos como prolina, poliaminas e trealose, entre outros, aumento da atividade de nitrato redutase e aumento no armazenamento de hidratos de carbono). Sob a seca, as plantas tentam manter o seu índice de água, acumulando vários solutos compatíveis não tóxicos e que não interferem com os processos da planta chamados, conseqüentemente, de solutos compatíveis (YANCEY *et al.*, 1982). Alguns deles são prolina, trealose, polióis, glicina, betaína e poliaminas, solutos estes semelhantes aos utilizados por bactérias halofílicas para a manutenção da osmolaridade. Como essa nova espécie de bactéria foi isolada em associação com a raiz da planta *B. portulacoides*, que no Brasil é normalmente encontrada em faixas de areia paralela à linha da praia na Restinga de Jurubatiba e é capaz de tolerar bem esta zona de estresse de salinidade (BERNAARDI & SEELIGER, 1989), pode ser que exista uma relação de correspondência entre esse grupo de bactérias halofílicas e essa espécie de planta, já que existem indícios que ambos podem compartilhar o mesmo mecanismo para manutenção da osmolaridade e

sobreviverem nesse ambiente hostil. Porém, serão necessários estudos mais aprofundados para elucidar melhor essa questão.

O fato de as peptidases produzidas por *H. blutaparonensis* apresentarem pH ótimo de atividade em torno da neutralidade é um indicativo para sua alocação nas classes de metalo e/ou serina peptidases. Na análise qualitativa em gel de gelatina-SDS-PAGE tratado com diferentes inibidores, a peptidase de 35 kDa foi inibida por 1,10-fenantrolina 10 mM, um potente inibidor de metalopeptidases. Já as peptidases com massas moleculares correspondentes a 45 kDa e 28 kDa foram caracterizadas como pertencentes à classe das serina peptidases, pois foram completamente inibidas por PMSF 10 mM, um inibidor irreversível desta classe proteolítica. Nos ensaios quantitativos por dosagem química, a peptidase majoritária (45 kDa) foi fortemente inibida por TLCK e antipaína e completamente inibida por PMSF, todos inibidores de serina peptidases, corroborando os dados obtidos em SDS-PAGE com substrato incorporado. A atividade da peptidase de 45 kDa foi também reduzida em torno de 50% quando tratada com EDTA 10 mM, um agente quelante de íons, especialmente o cálcio. Esse achado é consistente com o pequeno aumento da atividade enzimática quando tratada com íons Ca^{2+} . Relatos na literatura também descrevem a ativação e estabilização por Ca^{2+} em serina peptidases de origem bacteriana (KELLY & FOGARTY, 1976; STRONGIN *et al.*, 1978; WARD, 1983) e numa peptidase extracelular, denominada caldolisina, produzida por uma bactéria termofílica, *Thermus aquaticus* (COWAN & DANIEL 1982).

O comportamento dessa peptidase caracterizada nesse trabalho coincide em grande parte com os resultados encontrados nos trabalhos realizados para caracterização de serina peptidases, os quais mostram que estas geralmente demonstram atividade na faixa neutra-alcálica de pH, com o ótimo entre 7 e 11, suas massas moleculares variam entre 18 e 50 kDa, mas também já foi relatada massa molecular de 126 kDa para serina peptidase de *Blakeslea trispora* (FALTREZ & FERSHT, 1973; GOVIND *et al.*, 1981; BRENNER, 1988). Além disso, possuem também uma ampla especificidade por diferentes substratos protéicos (BARRETT, 1994). As peptidases produzidas por *H. blutaparonensis* demonstraram atividade sob todos os substratos testados (gelatina, caseína, hemoglobina e albumina). No entanto, apenas a serina peptidase majoritária de 45 kDa foi capaz de hidrolisar a hemoglobina, o que nos sugeriu a utilização da hemoglobina como um apropriado substrato para os ensaios de dosagem química, com o intuito de mensurar apenas a atividade da “principal” peptidase produzida por essa nova espécie bacteriana.

Peptidases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais (SINGH, VOHRA, SAHOO, 2003), representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo (BANERJEE *et al.*, 1999). As peptidases termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas industrialmente e representam cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo (BEG & GUPTA, 2002; BEG & GUPTA, 2003). Possuem uma grande variedade de aplicações, principalmente na indústria de detergente e de alimentos. Em vista da recente tendência de desenvolvimento de tecnologias ambientais limpas, peptidases são apreciadas por terem extensivas aplicações em tratamento de couro e em vários processos de biorremediação. São também amplamente utilizadas na indústria farmacêutica, de alimentos e detergentes.

Todos os detergentes que utilizam peptidases atualmente no mercado utilizam serina peptidases produzidas por linhagens de *Bacillus*. Um exemplo compatível com a peptidase caracterizada nesse trabalho é a produzida por *Conidiobolus coronatus*, descrita como sendo comparável com detergentes comerciais utilizados na Índia (PHADATARE, SRINIVASAN & DESHPANDE, 1993) por manterem 43% da sua atividade a 50°C por 50 min na presença de Ca²⁺ (25 mM) e glicina (1 M) (BHOSALE *et al.*, 1995). Muitos halofílicos extremos e moderados têm sido isolados e investigados para possíveis aplicações biotecnológicas, incluindo a produção de solutos compatíveis, recuperação aprimorada de petróleo e degradação de poluentes industriais em ambientes salinos (HOUGH & DANSON 1999; MADERN *et al.*, 2000; MARGESIN & SCHINER, 2001; SCHIRALDI *et al.*, 2002; VAN DEN BERG, 2003; GOMES & STEINER, 2004). Além disso, halofílicos produzem exoenzimas com um potencial valor comercial (THONGTHAI & SONTINANALERT, 1991; ADAMS & KELLY, 1995). A maioria das peptidases extracelulares de halófilos tem atividade máxima próxima ao pH neutro (NORBERG & HOFSTEIN, 1969; IZOTOVA *et al.*, 1983; SCHMITT *et al.*, 1990; STEPANOV *et al.*, 1992; KAMEKURA & SENO, 1990), o que coincide com o comportamento das peptidases descritas no atual trabalho, em especial a serina peptidase de 45 kDa.

Alguns microrganismos produzem uma quantidade baixa de enzimas, dificultando sua aplicação industrial, porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o seu rendimento enzimático (KUMAR & TAKAGI, 1999). A produção industrial de enzimas é freqüentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que por volta de

30 a 40% do custo envolvido na produção de peptidases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos, portanto sua otimização é de grande importância para a redução dos custos de produção (JOO & CHANG, 2005). O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos de produção (BOCCHINI *et al.*, 2005). Dentre estes resíduos incluem-se o soro de queijo (SISO, 1996) e a água de maceração de milho (KONA, QURESHI & PAI, 2001). Por conseguinte, a real influência da adição de extrato de levedura ao meio de cultura utilizado no presente trabalho deve ser avaliada futuramente, já que este é um suplemento de alto custo que inviabilizaria a produção de peptidases em grande escala.

Embora tenha havido um interesse crescente em estudos relacionados aos microrganismos halofílicos nos últimos anos, a maioria deles foi realizada em halofílicos extremos. No entanto, as bactérias halofílicas moderadas representam um excelente modelo de adaptação às freqüentes alterações de osmolaridade extracelular e constituem um interessante grupo de microrganismos do ponto de vista biotecnológico. A capacidade das bactérias halofílicas moderadas crescerem e produzirem enzimas sobre uma vasta gama de salinidade as torna muito atraentes para a busca e isolamento de enzimas com características incomuns.

A estabilidade térmica moderada, a comprovação de atividade em valores de pH neutro e alcalino e em diferentes concentrações de sal da serina peptidase de 45 kDa produzida por esta nova espécie bacteriana (*H. blutaparonensis*) sugerem que esta pode ter um potencial de aplicação na formulação de detergentes e na fermentação de peixes para produção de molhos, muito utilizados na culinária oriental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AEHLE, W. **Enzymes in industry: production and applications**. Trends in Biotechnology, 19, 400, 2004.
- ADAMS, M.W.W. & KELLY, R.M.. **Enzymes from microorganisms in extreme environments**. Chem. Eng. News 73, 32–42, 1995.
- AHUJA, S. K., FERREIRA, G.M. & MOREIRA, A. R.. **Utilization of enzymes for environmental applications**. Critical Review in Biotechnology, 24, 125-54, 2004.
- AKOLKAR, A.V., DESHPANDE, G.M., RAVAL, K.N., DURAI, D., NERURKAR, A.S. & DESAI, A.J.. **Organic solvent tolerance of *Halobacterium* sp SP1(1) and its extracellular protease**. J. Basic Microbiol. 48, 1-5, 2008.
- ARAÚJO, D. S. D., SCARANO, F. R., SÁ, C. F. C., KURTZ, B. C., ZALUAR, H. L. T., MONTEZUMA, R. C. M. & OLIVEIRA, R. C.. **Comunidades vegetais do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba**. Revista Brasileira de Zoologia, 18, 39-62, 1998.
- ASKER, D. & OHTA, Y.. **Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria**. Journal of Bioscience and Bioengineering, 88, 617-21, 1999.
- BAGAI, R. & MADAMWAR. D.. **Continuous production of halophilic α -amylase through whole-cell immobilization of *Halobacterium salinarium***. Applied Biochemistry Biotechnology, 62, 213–218, 1997.
- BANERJEE, U. C., SANIA, R.K., WAMIK AZMIA & W. AND SONIA, R.. **Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive**. Process Biochemistry, 35, 213-219, 1999.
- BARBOSA, D. C., VON DER WEID, I., VAISMAN, N. & SELDIN, L. **Halotolerant spore-forming Gram-positive bacterial diversity associated with *Blutaparon portulacoides* (St. Hill.) Mears, a pioneer species in Brazilian coastal dunes**. Journal of Microbiology Biotechnology, 16, 193-199, 2006.
- BARETT, A. J.. **Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases**. Methods Enzymol. 244, 1–15, 1994.
- BARRETT, A. J., NEIL, D. R., EMMET, A. J. & RAWLINGS. N. D.. **The MEROPS database as a protease information system**. Journal of Structural Biology, 134, 95-102, 2001.
- BEG, Q. K. & GUPTA, R.. **Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis***. Enzyme Microbial Technol., 32 (2), 294-304, 2003.
- BEG, Q. K., SAXENA, R. K. & GUPTA, R.. **De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations**. Process Biochemistry, 37 (10), 1103-1109, 2002
- BERNAARDI, H. & SEELIGER, U.. **Population biology of *Blutaparon portulacoides* (St. Hill.)Mears on Southern Brazilian backshore**. SBPC, Ciência e Cultura Comunicação, 1989.
- BHOSALE, S. H., M. B. RAO, V. V. DESHPANDE, & M. C. SRINIVASAN. **Thermostability of high activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20)**. Enzyme Microb. Technol. 17, 136–13, 1995.

- BIRSCHBACH, P.N.F.; HENDERSON, W., & WILLRETT, D., **Food Technology Enzymes: Tools for Creating Healthier and Safer Foods**, 58, 20-25, 2004.
- BOCCHINI, D.A., OLIVEIRA, O.M.M.F, GOMES, E. AND DA SILVA, R.. **Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation**. *Process Biochemistry*, 40, (12), 3653-3659, 2005.
- BOND, J.S. & BUTLER, P.E.. **Intracellular proteases**. *Annual Revision of Biochemistry* 56, 333-364, 1987.
- BOON M. A., VAN'T RIET K. & JANSSEN A.E.M.. **Enzymatic synthesis of oligosaccharides: product removal during a kinetically controlled reaction**. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 411–420, 2000.
- BRENNER, S.. **The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines**. *Nature* 334, 528–53, 1988.
- CAPIRALLA, H., HIROI, T., HIROKAWA, T. & MAEDA, S.. **Purification and characterization of a hydrophobic amino acid-specific endopeptidase from *Halobacterium halobium* S9 with potential application in debittering of protein hydrolysates**. *Process Biochem.* 38, 571-579, 2002.
- CARREA, G. & COLOMBO, G. **Coupling high enzyme activity and stability: a challenging target**. *Trends Biotechnol*, 18, 401, 2000.
- CASTRO,H.F., MENDES, A. A. & SANTOS J. C.. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, 27, 146-56, 2004.
- CLEMENTE, A., VIOQUE, J., SANCHEZ-VIOQUE, R., PEDROCHE, J. & MILLAN,F. **Effect of enzymatic hydrolysis on protein quality and antigenicity of chickpea protein isolate**. *Journal of Agricultura Food Chemistry*, 47, 377-681, 1999.
- COWAN, D.A. & DANIEL, R.M.. **Purification and some properties of an extracellular protease (caldolysin) from an extreme thermophile**. *Biochim. Biophys. Acta* 705, 293–305, 1982.
- CURTIS, R.I.. **Umami and the foods of classical antiquity**. *Am J Clin Nutr* 90, 712–718, 2009.
- D'AMICO, S., MARX, J. C., GERDAY, C. & FELLER, G.. **Activity-stability relationships in extremophilic enzymes**. *J. Biol. Chem.* 278, 7891-7896, 2003.
- DIVIESO, E.; DAGGER, F. & RASCÓN, A. **Leishmania mexicana: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity**. *Exp. Parasitol.* 116(1), 77-82, 2007.
- DODIA, M.S., RAWAL, C.M., BHIMANI, H.G., JOSHI, R.H., KHARE, S.K. & SINGH, S.P. **Purification and stability characteristics of an alkaline serine protease from a newly isolated haloalkaliphilic bacterium sp. AH-6**. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35, 121–131, 2008.
- DORNELES, L. P. P. & WAECHTER, J. L.. **Fitossociologia do componente arbóreo na floresta turfosa do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil**. *Acta Botanica. Brasilica*, 18, 815-824, 2004.
- ESTEVES, F. A. & LACERDA L. D. **The zooplankton and other limnological features of a humic coastal lagoon (Lagoa Comprida, Macé, R.J.) in Brazil**. *Brazilian Journal of Biology*, 50, 71-81, 2008.

ESTEVEES, F. A., CALIMAN, A., SANTANGELO, J. M., GUARIENTO, R. D., FARJALLA, V. F. & BOZELLI, R. L.. **Neotropical coastal lagoons: an appraisal of their biodiversity, functioning, threats and conservation management.** Brazilian Journal of Biology, 68, 967-981, 2008.

FARIAS, M. E. & FLORES, V.. **Effect of salinity on *Blutaparon portulacoides* (St. Hill.) Mears (Amaranthaceae): Relation between photosynthetic rate, sodium content, water economy, and growth at the foliar level.** Revista Brasileira de Biologia. 48, 155-164, 1989.

FARJALLA, V. F, ENRICH-PRAST, A., ESTEVES, F. A. & CIMBLERIS, A. C. P.. **Bacterial growth and DOC consumption in a tropical coastal lagoon.** Brazilian Journal of Biology, 66, 383-92, 2006.

FASTREZ, J., & A. R. FERSHT.. **Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin.** Biochemistry 12, 2025–2034, 1973.

FERMEGLIA M., BRAIUCA P., GARDOSI L., PRICL S. & HALLING P. J.. **In silico prediction of medium effects on esterification equilibrium using the COSMO-RS method.** Biotechnology Program, 22, 1146-52, 2006.

FERRER, M. **Metagenoma: acceso a los recursos potencialmente ilimitados de microorganismos no cultivables.** Sociedad Española de Microbiología Actualidad, 38, 11-17, 2004.

FERREIRA, E. O. & DIAS, D. A. A.. **Methylenedioxyflavonol from aerial parts of *Blutaparon portulacoides*.** Phytochemistry, 53, 145-147, 2000.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. www.sosmatatlantica.org.br, 2009

GALINSKI, E. A.. **Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection.** Cellular and Molecular Life Sciences, 49 (6-7), 487-496, 1993.

GALINSKI, E. A.. **Osmoadaptation in bacteria.** Advances in Microbiol Physiology, 37, 272-328, 1995.

GARGAGLIONI L. H., MEIER J. T., BRANCO L. G. & MILSOM W. K...**Role of midbrain in the control of breathing in anuran amphibians.** American Journal of Physiology - Regulatory Integrative Comparative Physiology, 293, 447-57, 2007.

GAUTHIER, S. F. & POULIOT, Y.. **Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins.** Journal Dairy Science, 86, 78-87, 2003.

GERDAY C., AITTALEB M., BENTAHIR M., CHESSA J. P., CLAVERIE P., COLLINS T., D'AMICO S., DUMONT J., GARSOUX G., GEORLETTE D., HOYOUX A., LONHIENNE T., MEUWIS M. A. & FELLER G. **Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology.** Trends in Biotechnology, 18, 103-7, 2000.

GEORGESCU-ROEGEN, N.. **Review of Social Economy.** Informaworld, 35, 361 – 375, 1977.

GIME'NEZ, M.I., STUDDERT, C.A., SA'NCHEZ, J.J. & CASTRO, DE, R.E.. **Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterization.** Extremophiles 4, 181-188, 2000.

GOMES, J. & W. STEINER. **The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes.** Food Technol. Biotechnol. 42: 223–235, 2004.

- GOVIND, N. S., MEHTA, B., SHARMA, M., & MODI, V. V.. **Protease and carotenogenesis in *Blakeslea trispora***. *Phytochemistry* 20:2483–2485, 1981.
- GUIMARÃES A. E., DE MELLO R. P., LOPES C. M., ALENCAR J. & GENTILE C.. **Prevalence of Anophelines (Diptera: Culicidae) during sunset in areas of the Itaipu Hydroelectric plant in Guaira county, state of Parana, Brazil**. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 92, 745-54, 1997.
- GUPTA R., BEG, Q. K. & LORENZ, P.. **Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications**. *Appl Microbiol Biotechnol* 59, 15-32. 2002.
- HARTLEY, B.S.. **Proteolytic enzymes**. *Annu. Rev. Biochem*, 29:45-72, 1960.
- HÄSE, C.C. & FINKELSTEIN, R.A.. **Bacterial extracellular zinc-containing metalloprotease**. *Microbiol. Ver.*, 823-827, 1993.
- HAMID REZA KARBALAEI-HEIDARI, MOHAMMAD ALI AMOOZEGAR, MAHBOD HAJIGHASEMI · ABED-ALI ZIAEE & ANTONIO VENTOSA **Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis*** *Ind Microbiol Biotechnol*, 36, 21–27, 2009.
- HEUSSEN, C. & DOWDLE, E. B.. **Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing SDS and copolymerized substrates**. *Anal Biochem*, 102(1): 196-202, 1980.
- HILMI, H.T., KYLÄ-NIKKILÄ, K., RA, R. & SARIS, P.E.. **Nisin induction without nisin secretion**. *Microbiology*, 152(5):1489-96, 2006.
- HOLMES, M. L. & SCOPES, R. K.. **Purification and analysis of an extremely halophilic beta-galactosidase from *Haloferax alicantei***. *Biochim Biophys Acta* 1337(2): 276-86, 1997.
- HOUGH, W.D. & M.J. DANSON. **Extremozymes**. *Curr. Opin Chem. Biol.* 3:39–46, 1999.
- IZOTOVA, L.S., STRONGIN, A.Y., CHEKULAEVA, L.N., STERKIN, V.E., OSTOSLAVSKAYA, V.I., LYUBLINSKAYA, L.A., TIMOKHINA, E.A. & STEPANOV, V.M.. **Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium***. *J Bacteriol.* 155(2), 826-30, 1983.
- JOO, H. S. & CHANG, C. S.. **Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties**. *Process Biochemistry*, 40 (3-4), 1263-1270, 2005.
- KAMEKURA, M. & SENO, Y.. **A halophilic extracellular protease from a halophilic archaeobacterium strain 172 P1**. *Biochem Cell Biol.* 68(1):352-9, 1990.
- KARBALAEI-HEIDARI, H.R., ZIAEE, A-A., SCHALLER, J. & AMOOZEGAR, M.A.. **Purification and characterization of an extracellular haloalkaline protease produced by the moderately halophilic bacterium, *Salinivibrio* sp. strain AF-2004**. *Enzyme Microb Technol* 40, 266– 272, 2007.
- KARBALAEI-HEIDARI, H.R., AMOOZEGAR, M.A., HAJIGHASEMI, M., ZIAEE, A.A. & VENTOSA, A.. **Production, optimization and purification of a novel extracellular protease from the moderately halophilic bacterium *Halobacillus karajensis***. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36 (1), 21-27, 2008.
- KELLY, C.T. & FOGARTY, W.M.. **Microbial alkaline enzymes**. *Process. Biochem.* 11, 3–9, 1976.

- KEUNGARP RYU, JUNGBAE KIM, JONATHAN S. & DORDICK.. **Catalytic properties and potential of an extracellular protease from an extreme halophile.** Enzyme and Microbial Technology, 16, 266-75, 1994.
- KNAPP S., LADENSTEIN R. & GALINSKI E. A.. **Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes beta-hydroxyectoine and betaine.** Extremophiles, 3, 191-8, 1999.
- KONA, R.P., QURESHI, N. & PAI, J.S.. **Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor.** Biores. Technol., 78, (2), 123-126, 2001.
- KUMAR, D. & BHALLA, T. C.. **Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications.** Appl Microbiol Biotechnol, 68, 726-36, 2005.
- KUMAR, C. G. & TAKAGI, H.. **Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint.** Biotechnol. Advances, 17, (5), 561-594, 1999.
- KUSHNERD, . J.. **Life in high salt and solute concentrations: halophilic bacteria.** In Microbial Life in Extreme Environments, London: Academic Press. 311-368. 1978.
- LAMA, L., ROMANO, I., CALANDRELLI, V., NICOLAUS, B. & GAMBACORTA, A. **Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus.** Res Microbiol 156, 478–484, 2005.
- LANYI, J.K.. **Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria.** Bacteriol. Rev. 38, 272-290, 1974.
- LEUNG D., ABBENANTE, G. & FAIRLIE, D. P.. **Protease inhibitors: current status and future prospects.** Journal of Medicinal Chemistry, 43, 305-41, 2000.
- LIESE, A., SEELBACH, K., WANDREY, C.. **Industrial Biotransformations.** Willey-VCH, 2006.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. & RANDALL, R.J.. **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** J Biol Chem, 193, 265-275, 1951
- MADERN, D., C. EBEL & G. ZACCAI. **Halophilic adaptation of enzymes.** Extremophiles 4, 91–98, 2000.
- MARANGOS C., ARAUJO BARBOSA A. C. & CECCALDI H. J. **Variation in the level of free amino acids during larva development of *Penaeus japonicus* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae).** Archives Internationales Physiologie Biochimie, 98, 41-51, 1990.
- MARGESIN, R. & F. SCHINNER. **Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology.** Extremophiles, 5, 73-83, 2001.
- MARTINS L. O., HUBER R., HUBER H., STETTER K.O., DA COSTA M. S. & SANTOS H.. **Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles.** Methods in Enzymology, 334, 302-15, 2001.
- MAURER, K. H. **Detergent proteases.** Current Opinion in Biotechnology, 15, 330-4, 2004.
- MCIVER, R., BROOKS & R., REINECCIUS, G.. **Flavor of fermented fish sauce.** J Agric Food Chem 30:1017–1020, 1982.
- MELLADO E, SÁNCHEZ- PORRO C, MARTÍN S & VENTOSA A.. **Extracellular hydrolytic enzymes produced by moderately halophilic bacteria.** In: Ventosa A (ed) Halophilic microorganisms. Springer, Berlin, 285–295, 2004.

- MILLER, J. A., JR. & NAGARAJAN, V.. **The impact of biotechnology on the chemical industry in the 21st century.** Trends in Biotechnology, 18, 190-1, 2000.
- MITRA, J.. **Genetics and genetic improvement of drought resistance of crop plants.** Current Science, v.80, p. 758-763, 2001.
- MOHAPARTA, B.R., BABERJEE & U.C., BAPUJI, M.. **Characterization of a fungal amylase from *Mucor* sp. associated with the marine sponge *Spirastrella* sp.** J Biotechnol 60:113–117. doi:10.1016/ S0168-1656(97)00197-1, 1998.
- MOUNTFORT, D. O. FREDERICK A. RAINEY, JUTTA BURGHARDT, HEINRICH F. KASPAR & ERKO STACKEBRANDT MOUNTFORT, D. O.. ***Psychromonas antarcticus* gen. nov., sp. nov., A new aerotolerant anaerobic, halophilic psychrophile isolated from pond sediment of the McMurdo ice shelf, antarctica.** Arch Microbiol 169, 231-8, 1998.
- MOURAO, K. S. & BELTRATI, C. M.. **Morphology and anatomy of developing fruits and seeds of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy (Clusiaceae).** Braz Journal of Biology, 61, 147-58, 2001.
- MYERS J. H., SIMBERLOFF D., KURIS A. M. & CAREY J. R.. **Eradication revisited: dealing with exotic species.** Trends in Ecology & Evolution, 15, 316-320, 2000.
- NAMWONG, S., HIRAGA, K., TAKADA, K., TSUNEMI, M., TANASUPAWAT, S. & ODA, K.. **A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* sp. SR5–3 isolated from Wsh sauce: puriWcation and characterization.** Biosci Biotechnol Biochem 70:1395–1401, 2006.
- NICHOLS P. D., LEEMING R., RAYNER M. S., LATHAM V., ASHBOLT N. J. & TURNER C.. **Comparison of the abundance of the fecal sterol coprostanol and fecal bacterial groups in inner-shelf waters and sediments near Sydney, Australia.** Journal of Chromatography 643, 189-95, 1993.
- NORBERG, P. & B.V. HOFSTEIN **Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria.** J. Gen. Microbiol. 55:251–256, 1969.
- PARK, J.N., ISHIDA, K., WATANABE, T., ENDOH, K., WATANABE, K., MURAKAMI, M. & ABE, H.. **Taste effects of oligopeptides in a Vietnamese fish sauce.** Fish Sci 68, 921–928, 2002.
- PETRUCIO, M. M. & ESTEVES F. A.. **Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*.** Revista Brasileira de Biologia, 60, 229-236, 2000.
- PHADATARE, S. U., SRINIVASAN, M. C. & DESHPANDE, V. V.. **High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): enzyme production and compatibility with commercial detergents.** Enzyme Microb. Technol. 15, 72–76, 1993.
- PRICE, N.C. & STEVENS, L.. **Fundamentals of Enzymology.** Oxford, 1989.
- RAO R. K., PHILIPPS A. F., WILLIAMS C. S., MCCRACKEN D. M. & KOLDOVSKY. **Luminal stability of insulin-like growth factors I and II in developing rat gastrointestinal tract.** Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition, 26, 179-85, 1998.
- REGULY, J. C. **Biotechnologia dos Processos Fermentativos.** Pelotas: EDUFPeL, 3, 2000.
- ROCHA, C. F., BERGALLO, H. G., VAN SLUYS, M., ALVES, M. A. S. & JAMEL, C. E. **The remnants of restinga habitats in the brazilian Atlantic Forest of Rio de Janeiro state, Brazil: habitat loss and risk of disappearanceBraz.** Journal of Biology. 67, 2007.

ROCHA C. F., HATANO F. H., VRCIBRADIC D. & VAN SLUYS M.. **Frog species richness, composition and beta-diversity in coastal Brazilian restinga habitats.** Brazilian Journal of Biology, 68, 101-7, 2008.

ROCHA, C. F. D, VAN SLUYS, M., BERGALLO, H. G. & ALVES, M. A. S.. **Endemic and threatened tetrapods in the restingas of the biodiversity corridors of Serra do Mar and of the Central da Mata Atlantica in eastern Brazil.** Brazilian Journal of Biology 65, 159-68, 2005.

ROOSE, J. P. & VAN NOORDEN, C. J.. **Synthetic protease inhibitors: promising compounds to arrest pathobiologic processes.** Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 125, 433-41, 1995.

SÁNCHEZ-PORRO, C., MELLADO, E., BERTOLDO, C., ANTRANIKIAN, G. & VENTOSA A.. **Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium Pseudoalteromonas sp. strain CP76.** Extremophiles 7, 221–228, 2003.

SANTOS, H. & DA COSTA, M. S.. **Organic solutes from thermophiles and hyperthermophiles.** Methods in Enzymology, 334, 302-315, 2001.

SÁ-PEREIRA, P., PAVEIA, H., COSTA-FERREIRA, M. & AIRES-BARROS, M.. **A new look at xylanases: an overview of purification strategies.** Molecular Biotechnology, 24, 257-81, 2003.

SCHIRALDI, C. & DE ROSA C. M.. **The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles.** Trends in Biotechnology, 20, 515-21, 2002.

SCHLEIF, R.F. & WENSINK, P.C.. **Practical Methods in Molecular Biology.** Spring-Verlag. New York, 1981.

SCHMITT, W., U. RDEST & W. GOEBEL, Efficient high performance liquid chromatographic system for the purification of a halobacterial serine protease. J. Chromatogr. 521, 211–220, 1990.

SHOWELL, M. S. **Enzymes, detergent.** In. **Encyclopedia of bioprocess technology, fermentation, biocatalysis and bioseparation,** Wiley & Sons, New York, 958-971, 1999.

SINGH, J., VOHRA, R. M. & SAHOO, D. K.. **Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture.** Process Biochem., 39 (9), 1093-1101, 2003.

SISO, M.I.G.. **The biotechnological utilization of cheese whey: a review.** Biores. Technol., 57 (1), 1-11, 1996.

SLESAREV, A. I., BELOVA, G. I., KOZYAVKIN, S. A. & LAKE, J. A.. **Evidence for an early prokaryotic origin of histones H2A and H4 prior to the emergence of eukaryotes.** Nucleic Acids Research, 26, 427-30, 1998.

SMALAS, A. O., LEIROS, H. K., OS, V. & WILLASSEN, N. P.. Biotechnol. Annu. Rev. 6, 1–57, 2000.

STEPANOV, V.M., RUDENSKAYA, G.N., REVINA, L.P., GRYAZNOVA, Y.B., LYSOGORSKAYA, E.N., FILIPPOVA, I.Y.U. & IVANOVA, I.I.. **A serine proteinase of an archaeobacterium, *Halobacterium mediterranei*. A homologue of eubacterial subtilisins.** Biochem J. 285 (1), 281-6, 1992.

STRONGIN, A.Y.A., L.S. TZOTOVA, Z.T. ABRAMOV, D.I. GORODETSKY, L.M. ERMAKOVA, L.A. BARATOVA, L.P. BELYANOVA & V.M. STEPANOV. **Intracellular serine protease of *Bacillus subtilis*: sequence homology with extracellular subtilisin.** J. Bacteriol. 133, 1401–1411, 1978.

TAIRA, W., FUNATSU, Y., SATOMI, M., TAKANO, T. & ABE, H.. **Changes in extractive components and microbial proliferation during fermentation of fish sauce from underutilized fish species and quality of final products.** Fish Sci 73, 913–923, 2007.

THONGTHAI, C. & P. SONTINANALERT. Halophiles in Thai fish sauce: general and applied aspects of halophilic bacteria. Vol. 20. Ed. F.R. Rodriguez-Valera. Plenum Press, New York, pp 381–389, 1991.

TRUPER, H. G. & GALINSKI, E.A.. **Biosynthesis and fate of compatible solutes in extremely halophilic phototrophic eubacteria.** FEMS Microbiology Letters, 75, (2-3), 247-254, 1990.

VAN DEN BERG, B. **Extremophiles as a source for novel enzymes.** Curr. Opinion Microbiol. 6, 213–218, V

VALDIVIESO, E., DAGGER, F. & RASCÓN, A. **Leishmania mexicana: identification and characterization of an aspartyl proteinase activity.** Exp. Parasitol. 116(1), 77-82, 2007.

VERMELHO, A. B., DE SIMONE, G., D'AVILA-LEVY, C. M., SANTOS, A. D. S., MELO, A. C. N., SILVA JR. F. P., BOM, E. P. S. & BRANQUINHA, M. H.. **Trypanosomatid Peptidases: A Target for Drugs Development.** Current Enzyme Inhibition, 3, 19-48, 2007.

VIDYASAGAR, M., PRAKASH, S., LITCHFIELD & C., SREERAMULU, K.. **Purification and characterization of a thermostable, haloalkaliphilic extracellular serine protease from extreme halophilic archaeon Halogeometricum borinquense strain TSS101.** Archaea 2, 51e57, 2006.

WARD, O.P. **Proteinases.** Microbial Enzymes and Biotechnology. Ed. W.M. Fogarty. Applied Science Publication, New York, 251–317, 1983.

WARD, O.P. & MOO-YOUNG, M., **Thermostable enzymes.** Biotechnol. Adv.6, 39-69, 1998.

WHITE, W. B.. **Karst: Karst Geomorphology.** Science, 232, 1034-1035, 1986.

WHITEHEAD, L. A., STOSZ S. K. & WEINER R. M.. **Characterization of the agarase system of a multiple carbohydrate degrading marine bacterium.** Cytobios 106, 99-117, 2001.

YANCEY, P.H., CLARK, M.E., HAND, S.C., BOWLUS, R.D. & SOMERO, G.N. **Living with water stress: evolution of osmolyte systems** Science, Vol 217, 1214-1222, 1982.

YONGSAWATDIGUL, J., RODTONG, S. & RAKSAKULTHAI, N.. **Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures.** J Food Sci 72, 382–390, 2007.

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](#)