



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

JOSÉ MANOEL WANDERLEY DUARTE NETO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA POR
PENICILLIUM AURANTIOWISEUM URM 4622 EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA VISANDO APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Recife
2018

José Manoel Wanderley Duarte Neto

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA POR
PENICILLIUM AURANTIODEURUM URM 4622 EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA VISANDO APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPgBAS), do Laboratório de Immunopatologia Keizo Asami (LIKA), Área de Concentração em Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientadora: Profa. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Carolina de Albuquerque Lima

Recife

2018

Duarte Neto, José Manoel Wanderley

Purificação e caracterização de protease produzida por *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622 em fermentação submersa visando aplicação biotecnológica/ José Manoel Wanderley Duarte Neto- 2018.

42 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Lúcia F. Porto

Coorientadora: Carolina A. Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde. Recife, 2018.

Inclui referências e anexos

1. Enzimas proteolíticas 2. Fungos filamentosos- biotecnologia 3. Materiais nanoestruturados I. Porto, Ana Lúcia F. (orient.) II. Lima, Carolina A. (coorient.) III. Título

572.76

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018-123

José Manoel Wanderley Duarte Neto

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PROTEASE PRODUZIDA POR
PENICILLIUM AURANTIOGRISEUM URM 4622 EM FERMENTAÇÃO
SUBMERSA VISANDO APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

Tese de Doutorado apresentada ao ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde (PPgBAS), do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Área de Concentração em Biotecnologia em Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Orientadora)
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Prof^a. Dr^a. Carolina de Albuquerque Lima (Co-orientadora)
Universidade de Pernambuco (UPE)

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior (Membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Neves Petersen (Membro externo)
Aalborg University (AAU)

Prof. Dr. Lorenzo Pastrana Castro (Membro externo)
International Iberian Nanotechnology Laboratory (INL)

Prof^a. Dr^a. Maria Carolina de Albuquerque Wanderley (Membro externo)
Laboratório de Tecnologia de Bioativos, LABTECBIO

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Catarina e Carlos, e minha irmã,
Juliana.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo e todos ao meu redor, por me guiar e me dar forças para seguir em frente.

Aos meus pais, Carlos e Catarina, pelo amor, apoio e dedicação incondicional. À minha irmã, Juliana, pelo amor e pelas inúmeras vezes que me ajudou direta e indiretamente. Às minhas avós queridas pelo amor e carinho de sempre. Aos meus tios e primos pelo apoio e amizade.

À minha orientadora, Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto, que é exemplo de profissional e sumariza o esforço de um grupo em contribuição à ciência e sociedade. Agradeço por todo o apoio e estímulo, além de seu trabalho de direcionamento, instrução e orientação.

À minha co-orientadora, Prof. Dra. Carolina Albuquerque de Lima, pela disponibilidade e contribuição científica. Além de sua educação e respeito.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Maria Carolina, Anderson, Thiago, Roberta e Mirella, por toda a ajuda que me deram de forma científica e pessoal, por todo apoio e amizade. Aos integrantes do Labtecbio, Patyanne, Thiago, Meire, Juanize, Prof. Dani Viana, Prof. Romero, Prof. Cynthia, Prof. Poli, Prof. Raquel, Prof. Taciana e tantos outros. Ao LIKA, UFPE e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde por todo incentivo e apoio oferecido. Ao Labtecbio, à UFRPE pela disponibilização de sua estrutura e laboratórios.

À professora Teresa, pela oportunidade do doutorado sanduíche, pela calma, sabedoria e simplicidade com a qual ela leva a vida, servindo de inspiração para quem a cerca. À Jonatas pelo companheirismo e amizade que tanto me ajudou enquanto estive fora. À Odete e Flávia, que me auxiliaram e acompanharam durante o processo.

Aos professores participantes da banca avaliadora pela presença e contribuições para este trabalho.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do Doutorado.

E a todos os outros que acreditam e contribuíram com minha jornada até o momento.

“Não alcançamos a liberdade buscando a liberdade, mas sim a verdade. A liberdade não é um fim, mas uma consequência”

Léon Tolstoi

RESUMO

Proteases desempenham papéis cruciais em diversos processos metabólicos e são o grupo de enzimas de maior importância industrial no mercado mundial. Através do processo de imobilização de proteínas é possível aumentar a produtividade numa escala industrial, incluindo processos de catálise de reações e purificação de biomoléculas. A caracterização da enzima fornece informações que ajudam na compreensão do mecanismo de ação e regulação da sua atividade catalítica. Além disso, através da ação dessas proteases é possível obtenção de peptídeos bioativos que vem sendo utilizados para promoção da saúde e prevenção de doenças. A presente tese relata a produção da protease de *Penicillium aurantiogriseum* e sua imobilização em nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina, purificação da enzima utilizando seu substrato imobilizado nas mesmas partículas e caracterização da protease, além da obtenção de peptídeos antioxidantes pela hidrólise da caseína bovina. A partir dos resultados, foram publicados dois artigos principais: o primeiro intitulado “Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides’ obtainment”, na revista *Preparative Biochemistry and Biotechnology*; e o segundo “Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*”, na revista *Protein Expression and Purification*. Além das publicações principais, foram publicados mais três artigos em colaboração ao decorrer do doutorado, dispostos em anexo. Tais estudos foram essenciais para a elucidação das características dessa nova enzima e sua aplicabilidade industrial, além de contribuir com o conhecimento sobre o potencial biotecnológico de espécimes da microbiota nacional.

Palavras-chave: Imobilização. MALDI-TOF. Peptídeos Bioativos.

ABSTRACT

Proteases play crucial roles in various metabolic processes and constitute the group of enzymes of major industrial importance in the world market. Through the process of protein immobilization, it is possible to increase productivity on an industrial scale, including processes of reactions catalysis and biomolecules purification. The enzyme characterization provides information that helps understanding the mechanism of action and regulation of its catalytic activity. In addition, through the action of these proteases it is possible to obtain bioactive peptides that have been used for health promotion and disease prevention. The present thesis reports the *Penicillium aurantiogriseum* protease production and its immobilization in polyaniline coated magnetic nanoparticles, purification of the enzyme using its substrate immobilized on the same particles and characterization of the protease, besides the obtainment of antioxidant peptides by bovine casein hydrolysis. From these results, two main articles were published: the first entitled "Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment", on Preparative Biochemistry and Biotechnology journal; and the second article entitled "Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*", on Protein Expression and Purification journal. In addition to the main publications, three more articles were published in collaboration, during the doctorate, supplied in annex. The main studies were essential for elucidating this new enzyme characteristics and its industrial applicability, besides contributing with the knowledge about the biotechnological potential of specimens from national microbiota.

Keywords: Immobilization. MALDI-TOF. Bioactive Peptides.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	OBJETIVOS	13
1.1.1	Objetivo Geral	13
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	PROTEASES	14
2.1.1	Importância Biotecnológica	15
2.2	FUNGOS FILAMENTOSOS	16
2.2.1	Gênero <i>Penicillium</i>	16
2.2.2	Microbiota do Nordeste Brasileiro	17
2.2.3	Protease de <i>Penicillium</i>	17
2.3	PETÍDEOS BIOATIVOS	18
2.4	IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS	20
2.4.1	Imobilização Enzimática	20
2.5	NANOMATERIAIS	21
2.5.1	Nanopartículas Magnéticas	22
2.6	PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	23
2.6.1	Purificação por partículas magnéticas	23
3	METODOLOGIA	25
3.1	MICRO-ORGANISMO	25
3.2	PRODUÇÃO DA ENZIMA	25
3.3	IMOBILIZAÇÃO DA PROTEASE	25
3.4	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO	26
3.5	OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE VIA RSM	26
3.6	PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEASE	27
3.7	CONCENTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA	27
3.8	PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E REUSO	27
3.9	PREPARAÇÃO DE HIDROLISADOS DE CASEÍNA	28
3.10	PMF E SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS	28
3.11	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	29
4	RESULTADOS	30

4.1	OPTIMIZATION OF <i>PENICILLIUM AURANTIOGRISEUM</i> PROTEASE IMMOBILIZATION ON MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ANTIOXIDANT PEPTIDES' OBTAINMENT.....	30
4.2	SINGLE STEP PURIFICATION VIA MAGNETIC NANOPARTICLES OF NEW BROAD PH ACTIVE PROTEASE FROM <i>PENICILLIUM AURANTIOGRISEUM</i>	32
5	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36
	APÊNDICE A - COLLAGENOLYTIC ENZYMES PRODUCED BY FUNGI: A SYSTEMATIC REVIEW, PUBLICADO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY, DOI: 10.1016/J.BJM.2016.08.001	40
	APÊNDICE B - PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGENASE BY <i>PENICILLIUM SP.</i> UCP 1286 ISOLATED FROM CAATINGA SOIL, PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF APPLIED BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, DOI: 10.7324/JABB.2016.40401	41
	APÊNDICE C - PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A COLLAGENASE FROM <i>PENICILLIUM SP.</i> UCP 1286 BY POLYETHYLENE GLYCOL-PHOSPHATE AQUEOUS TWO- PHASE SYSTEM, PUBLICADO NA REVISTA PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, DOI: 10.1016/J.PEP.2017.02.010	42

1 INTRODUÇÃO

Proteases são enzimas caracterizadas pela capacidade de degradar ligações peptídicas. Estas configuram o grupo de enzimas mais importantes fisiologicamente por desempenharem papéis cruciais em diversos processos metabólicos em todos os organismos vivos (HSIAO et al., 2014). Além disso, essas enzimas proteolíticas são o grupo de enzimas de maior importância industrial e respondem por mais de 65% do mercado mundial. Sendo utilizadas principalmente nas indústrias de detergentes, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016). No mercado mundial, 40% das enzimas tem como fonte produtora um microorganismo, que são preferidos com fonte devido a uma série de vantagens como crescimento acelerado e diversidade bioquímica. Os fungos apresentam características vantajosas adicionais, a exemplo da produção extracelular que facilita a recuperação da enzima (ROSSO et al., 2012).

Além do apelo econômico e médico associado à sua atividade catalítica, as proteases ganham importância pelo valor agregado aos produtos da catálise, como aminoácidos e peptídeos de interesse. Fisiologicamente os peptídeos constituem um grupo de importantes moléculas com participação em diversos processos biológicos. (MOONEY et al., 2013). Peptídeos vem sendo utilizados para promoção da saúde ou prevenção de doenças como ingredientes em alimentos funcionais, cosméticos ou medicamentos. Algumas das atividades biológicas descritas são atividade imunomoduladora, antimicrobiana, opióide, inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), ligante de minerais, antitrombótica, osteoprotetora, antilipidêmica, hipocolesterolêmica, regulação hormonal e antialérgica (KUNDA et al., 2012; MURO URISTA et al., 2011; PIHLANTO, 2013).

O processo de atividade catalítica e obtenção do produto da hidrólise pode ser melhorado de diversas maneiras, uma delas é através do sistema de imobilização de proteínas. Considerado um dos processos mais inovadores e recentemente bem estudados sistemas para aumentar a produtividade numa escala industrial. Diversas técnicas de imobilização já são utilizados em diversos setores industriais (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). Enzimas imobilizadas apresentam estabilidade marcante, que rende uma maior

aplicabilidade para produção industrial. (LI; DING; ZHOU, 2013). Nesse contexto, partículas magnéticas surgiram como uma nova plataforma promissora como suporte para imobilização de proteínas e enzimas (ZHU et al., 2016). Partículas magnéticas vem se tornando amplamente utilizadas em processos de separação e purificação com sucesso, rapidez e facilidade de aplicação em larga escala, principalmente para amostras biológicas (MIRAHMADI-ZARE et al., 2016). Uma estratégia seria utilizar ligantes previamente imobilizados na partícula que tenham afinidade pela proteína alvo (BARBOSA et al., 2015). Nessa conjuntura, a busca por novas proteases promissoras para aplicação industrial e médica, em conjunto com processos de imobilização que facilitem sua aplicação e aumentem produtividade, são de grande interesse econômico e social.

Com os resultados obtidos durante o doutorado, foram publicados dois artigos principais, intitulados:

- Optimization of *Penicillium aurantiogriseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment. Publicado na revista *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, DOI: 10.1080/10826068.2017.1292286
- Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiogriseum*. Publicado na revista *Protein Expression and Purification*. DOI: 10.1016/j.pep.2018.01.016

Além das publicações principais, foram publicados mais três artigos em colaboração, dispostos em anexo na tese:

- Collagenolytic enzymes produced by fungi: a systematic review. Publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology*. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.08.001
- Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium* sp. UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil. Publicado na revista *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. DOI: 10.734/JABB.2016.40401.

Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp. UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase system. Publicado na revista *Protein Expression and Purification*. DOI: 10.1016/j.pep.2017.02.010

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

A presente tese teve como objetivo a utilização de um fungo filamentoso da microbiota brasileira, isolado em Pernambuco, o *Penicillium aurantiogriseum*, para produção, purificação e caracterização de protease com propriedades de interesse industrial. Além da imobilização dessa protease para aplicação na obtenção de peptídeos antioxidantes, com potencial uso na indústria alimentícia.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Produzir protease em cultura líquida submersa utilizando o *Penicillium aurantiogriseum* URM4622;
- Otimizar a imobilização da enzima através de planejamento fatorial completo e metodologia de superfície de resposta;
- Imobilizar azocaseína e utilizar o derivado na purificação da protease produzida pelo *P. aurantiogriseum*;
- Caracterizar a enzima, livre e imobilizada, quanto aos aspectos físico-químicos, tais como: pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade ao pH e à temperatura, ação de inibidores;
- Utilizar a protease livre e imobilizada na hidrólise da caseína bovina e testar atividade antioxidante dos peptídeos gerados através de metodologias de sequestro de radicais;
- Sequenciar os peptídeos gerados pela hidrólise da caseína através de Espectrometria de Massa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEASES

Proteases (EC 3.4.21-24), também conhecidas como Peptidases, configuram o grupo mais importante de enzimas, caracterizadas pela capacidade de degradar ligações peptídicas. Essas enzimas desempenham papel importante em diversos processos metabólicos em todos os organismos vivos. Proteases especializadas para quebra de ligações N ou C terminais dos polipeptídeos são consideradas exopeptidases, enquanto que aquelas que possuem preferência pela quebra de ligações internas à cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases. (HSIAO et al., 2014; SIRITAPETAWEE et al., 2012).

A grande importância fisiológica e metabólica desse grupo de enzimas fica evidente pela sua presença em todos os organismos vivos (GRAMINHO et al., 2013). Elas configuram a maior família de enzimas nos seres humanos. As proteases podem estar relacionadas à ativação e inativação de proteínas, alteração completa da atividade de uma proteína, liberação de “neo-proteínas” com atividades fisiológicas, e regulação de grande número de processos biológicos importantes para a manutenção da homeostase, como replicação de DNA, progressão do ciclo celular, Proliferação e morte celular, além de processos patológicos como o câncer e inflamações (ROGERS; OVERALL, 2013). Já as proteases extracelulares estão relacionadas, principalmente, a quebras de proteínas e polipeptídeos em pequenos peptídeos e aminoácidos com o propósito de absorção celular (GRAMINHO et al., 2013).

Proteases ainda podem ser subdivididas em grupos de acordo com os aminoácidos que compõem seu sítio ativo em aspártico, glutâmico, serino e treonino proteases, além de serem classificadas como metaloproteases quando íons metálicos são requisitados em atividades catalíticas (HSIAO et al., 2014). A estrutura e sítio ativo estão diretamente relacionados à especificidade da protease, além das possíveis interações proteína-proteína e sinalização da regulação celular interna e externa (GRAMINHO et al., 2013). A caracterização das proteases por sítio ativo permite que elas sejam agrupadas em famílias de mecanismos de ação semelhantes e estrutura similar, embora pareça ser fácil, nem sempre a classificação de proteases se encaixa facilmente no sistema de

classificação internacional (TAVANO, 2013). Porém, para se compreender por completo a função celular de uma protease, é preciso conhecer as proteínas processadas por ela, além de suas funções e os eventos específicos que ocorrem com seus substratos (ROGERS; OVERALL, 2013).

2.1.1 Importância Biotecnológica

A quebra de ligações peptídicas pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos. Processos químicos, que englobam hidrólise ácida e alcalina, são muitas vezes difíceis de controlar e podem levar à alterações de aminoácidos. Condições de hidrólise ácida podem destruir o triptofano e a hidrólise alcalina pode reduzir diversos aminoácidos, como cistina e argenina, formando aminoácidos mais raros, como a lisinoalanina ou lantionina. Nesse contexto as enzimas são utilizadas por serem mais facilmente controladas, aplicadas em condições mais amenas e apresentam especificidade de reações com menos efeitos adversos. Porém processos enzimáticos podem apresentar inibidores, cofatores e sofrer autólise. Assim, estudos envolvendo aplicação de proteases para obtenção de peptídeos preservados configura uma importante ferramenta biotecnológica (TAVANO, 2013). Dessa forma, proteases vem sendo preferidas aos processos químico em diversos sistemas e processos industriais para aumentar a eficiência e o custo-benefício (BOUACEM et al., 2015).

As enzimas proteolíticas são um grupo de enzimas de grande importância industrial e respondem por mais de 65% das enzimas comercializadas internacionalmente. Sendo utilizadas principalmente nas indústrias de detergentes, farmacêutica, biotecnológica e de alimentos (OZTURKOGLU-BUDAK et al., 2016). Pela estimativa da Allied Market Research, a indústria mundial de enzimas deve manter um crescimento (CAGR) de 7,8% entre 2015-2020, atingindo um valor de 5,4 bilhões de dólares/ano, fazendo do mercado de proteases de 3,51 bilhões de dólares (CHEMICAL WEEKLY, 2015).

Na área médica, proteases vem sendo utilizadas no tratamento de cânceres, de fibroses, de queimaduras e feridas, dentre outras (SIRITAPETAWEE et al., 2012). Na produção de detergentes, enzimas são adicionadas para facilitar o processo de retirada de manchas difíceis, fazendo

do produto ecologicamente correto, não danificando o meio ambiente. Detergentes representam a maior e mais importante aplicação de enzimas comerciais pois responde por aproximadamente 40% do mercado de enzimas (SEN et al., 2016). Já na indústria de alimentos, proteases são muito utilizadas para amaciar carne e derivados, para clarificar sucos e cerveja, para produção de queijos e outros laticínios, na panificação, na extração de corantes e saborizantes de plantas, para produzir hidrolizados (como peptídeos bioativos), além da produção de aditivos proteicos para a indústria de rações (DADSHAHI et al., 2016). Enzimas produzidas por microorganismos são preferidas às enzimas de animais ou plantas, devido à uma série de vantagens como crescimento acelerado e diversidade bioquímica (ROSSO et al., 2012).

2.2 FUNGOS FILAMENTOSOS

Fungos e leveduras são grupos de microrganismos de grande importância ecológica, sendo possível encontra-los em todos os ambientes do mundo, pois apresentam adaptações à variados ambientes. Algumas espécies são especialmente importantes para a humanidade devido a sua importância médica e/ou biotecnológica (STUBIGER et al., 2016). Assim, 40% das enzimas do mercado mundial tem como fonte produtora um microorganismo. Os fungos apresentam características vantajosas adicionais, a exemplo da produção extracelular que facilita a recuperação da enzima (ROSSO et al., 2012). Fungos filamentosos contribuíram e continuam contribuindo largamente com diversos setores da indústria. Esses fungos são bastantes versáteis e conseguem se desenvolver em uma expansiva gama de diferentes substratos, incluindo rejeitos industriais de baixo custo, e produzir uma grande gama de ácidos, enzimas, carboidratos, dentre outros produtos de alto valor agregado. Esses fungos crescem uniformes em longos filamentos distribuídos através do meio ou os filamentos podem se envolver em aglomerados, facilitando a sua retirada do meio (FERREIRA et al., 2016).

2.2.1 Gênero *Penicillium*

O gênero *Penicillium* e suas espécies relacionadas mesofílicas, termofílicas e ácido-toletantes, são capazes de produção de proteases extracelulares, uma característica de interesse industrial. Espécies de

Penicillium são altamente disseminadas naturalmente, podendo ser encontradas em solos e frutas decaídas por causa da sua natureza nutricionalmente pouco exigente o que lhes permite crescer em uma gama de condições diversificada (GRAMINHO et al., 2013).

Este gênero é caracterizado por um micélio vegetativo formado por estreitas hifas hialinas septadas (pálidas ou fortemente coloridas), em ágar formam um tapete de tecido; ramos férteis (conidióforos) se elevam mais ou menos perpendiculares as hifas submersas ou aéreas, a porção basal ou haste principal (estipe ou conidióforos) septadas, relativamente estreita, tendo uma estrutura ramificada de frutificação no vértice, o último (conidióforo, penicillus) pode consistir de células conidiogenas (fiálides) suportadas diretamente no ápice dos conidióforos ou em um ou mais níveis de ramos; as células conidiogenas são geralmente em forma de frasco com uma base inchada estreitamento gradual ou abrupto a um tubo interno onde conídios (esporos) são produzidos em cadeias não ramificadas basais, ou seja, com o mais velho na parte superior, o conídios são asseptados, hialinos, pequenos, de formas variando de globosa à cilíndrica, e suave a fortemente áspera (ONIONS; BRADY, 1987).

2.2.2 Microbiota do Nordeste Brasileiro

A diversidade microbiana brasileira não é bastante estudada, com ecossistemas de condições climáticas bastante diferenciadas que podem promover a presença de microrganismos com composição taxonômica e funcional distintas em relação a outros locais (MENEZES et al., 2012; PACCHIONI et al., 2014). Pouco se sabe sobre a diversidade de fungos filamentosos do nordeste brasileiro, embora estudos tenham isolado fungos celulolíticos do solo na região semi-árida do Estado de Pernambuco, outros relataram Hifomicetos e Mucorales nos solos contaminados por atividades de mineração na região semi-árida do Estado da Bahia, ainda outros estudaram fungos micorrízicos arbusculares e Hifomicetos na região de Xingó, mais recentemente ocorreu o levantamento de fungos filamentosos do solo da região de Buíque. Esses estudos revelam que os fungos cosmopolitas anamórficos de solo são prevalentes, especialmente os dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, mais abundantes (OLIVEIRA et al., 2013).

2.2.3 Proteases de *Penicillium*

O *Penicillium aurantiogriseum* é considerado uma das espécies de fungos mais comuns em cereais com ocorrência mundial, além de não ser um fungo patógeno humano clássico. Este fungo filamentoso pode ser comumente encontrado nos solos de Pernambuco - Brasil e pertence a um gênero muito estudado com habito saprófita e poucos requisitos nutricionais (CRUZ et al., 2013; LUND; FRISVAD, 1994). O *P. aurantiogriseum* URM 4622 obtido da micoteca da UFPE, inscrito no Commonwealth Mycological Institute (CMI) e afiliado à World Federation for Culture Collections (WFCC) foi estudado anteriormente e produz uma protease alcalina extracelular (tipo Serino-peptidase) capaz de hidrolisar diferentes proteínas. Suas características tornam essa protease interessante para aplicações industriais (LIMA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2008).

Diversas espécies do gênero *Penicillium* são utilizadas biotecnologicamente por sua capacidade de produção de proteases e outras enzimas. Exemplos mais conhecidos são *P. camemberti*, *P. citrinum*, *P. griseoroseum*, *P. restrictum*, *P. roqueforti*. A maioria das proteases produzidas por esses fungos são alcalinas e produzidas em fermentação submersa, embora algumas espécies produzam proteases ácidas em meio líquido, como o *P. griseoroseum* e *P. camemberti*. Essas proteases vêm sendo aplicadas em diversos setores da indústria e possuem valor tanto devido à sua capacidade catalítica, como valor associado ao produto gerado por essa catálise, como alguns peptídeos (IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, 2007).

2.3 PEPTÍDEOS BIOATIVOS

Proteínas alimentares sempre foram consideradas de grande valor nutricional devido a sua composição com aminoácidos essenciais para manutenção celular, crescimento e energia. Mais recentemente começaram a ser consideradas o valor dos peptídeos liberados através das proteases gastrointestinais que apresentavam propriedades bioativas. Peptídeos bioativos são pequenas sequências peptídicas, normalmente de 2 a 30 aminoácidos, que possui atividade biológica significativa quando consumido (RYDER et al., 2016). Esses fragmentos estão contidos em sua proteína-mãe sem exercerem suas propriedades bioativas, passando a apresentar tais propriedades após a

sua liberação através da ação de enzimas proteolíticas, sendo os efeitos fisiológicos desses peptídeos podendo ser negativo ou positivo (MOHANTY et al., 2016).

Fisiologicamente os peptídeos constituem um grupo de importantes moléculas com participação em diversos processos biológicos. Eles correspondem ao maior grupo de hormônios, atuam como agentes imunomoduladores, interagem com citocinas, receptores e proteínas de sinalização, além de regular sistemas de interação proteica. Alguns peptídeos são sinalizadores de agregação na regulação de populações de bactérias da microbiota intestinal, atuam na inibição ou ativação enzimática e como receptores de toxinas e venenos além de atuar no rompimento de membranas celulares, os peptídeos antimicrobianos (MOONEY et al., 2013).

Para liberação desses peptídeos com atividade biológica pode ocorrer hidrólise da proteína-mãe por uma protease livre, pode haver fermentação por bactérias ou processos químicos. Diversas proteínas fontes de peptídeos com atividade biológica já foram elucidadas, sendo encontradas no leite, nos ovos, nas carnes, nos peixe, bem como diferentes fontes de proteína vegetal: como soja, trigo e brócolis (ABIDI et al., 2013). Devido a essa atividade biológica benéfica os peptídeos podem ser utilizados na composição de alimentos funcionais, nutracêuticos e drogas naturais. Tais efeitos podem vir a ser utilizados no tratamento da diarreia, hipertensão, trombose, cáries dentárias, estresse oxidativo, absorção de minerais e imunodeficiência, dentre outros (HAQUE; CHAND; KAPILA, 2008). Peptídeos vem sendo utilizados para promoção da saúde ou prevenção de doenças como ingredientes em alimentos, cosméticos ou medicamentos. A figura 2 ilustra algumas das atividades biológicas descritas, como atividade imunomoduladora, antimicrobiana, opióide, inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), ligante de minerais, antitrombótica, osteoprotetora, antilipidêmica, hipocolesterolêmica, regulação hormonal e antialérgica (KUNDA et al., 2012; MURO URISTA et al., 2011; PIHLANTO, 2013).

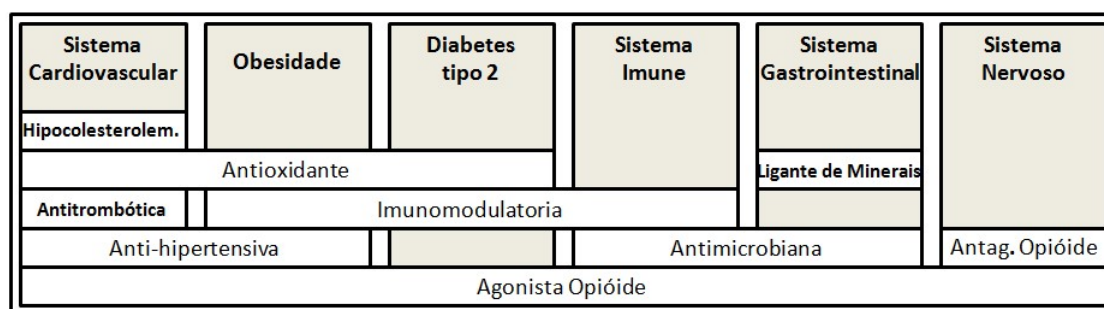


Figura 1. Atividades biológicas de peptídeos derivados de alimentos (HARTMANN; MEISEL, 2007).

A combinação correta entre a fonte proteica, enzimas específicas e processo de liberação apresentam grande importância na liberação correta de peptídeos bioativos e influenciam diretamente nas suas propriedades fisiológicas (MURO URISTA et al., 2011). Por exemplo, peptídeos menores são menos susceptíveis a outras degradações proteolíticas, aumentam sua biodisponibilidade e a presença de resíduos hidrofóbicos na cadeia peptídica também auxilia nesse processo (RYDER et al., 2016). Diversos mecanismos podem ser realizados para aumentar a eficiência de processos enzimáticos e obtenção desses, como estratégias de imobilização de proteínas.

2.4 IMOBILIZAÇÃO DE PROTEÍNAS

Proteínas imobilizadas são aquelas que estão fisicamente confinadas ou localizadas em certa região definida do espaço, com retenção das suas propriedades, e que podem ser usadas repetidamente e continuamente (Chibata, et al. 1978). Além de facilitar a manipulação das proteínas e o controle de sua atividade, aumentando sua estabilidade no armazenamento e aplicação. A imobilização pode também facilitar a separação e purificação de produtos, minimizando ou até evitando a liberação da proteína ou enzima (MOHAMAD et al., 2015).

O sistema de imobilização de proteínas é um dos mais inovadores e recentemente bem estudados sistemas para aumentar a produtividade numa escala industrial. Através desse sistema é possível superar grande parte das barreiras de produção e melhorar a recuperação de enzimas e reutilizá-las, aumentar a estabilidade, atividade e seletividade das moléculas, atingir maior resistência a inibidores, eliminar passos de separação e purificação, e

consequentemente aumentar a eficiência do processo. Diversas técnicas de imobilização e diferentes materiais já são aplicados em diversos setores industriais, como processamento de alimentos, produção biomédica, tratamento de efluentes, indústria têxtil e de detergentes e produção de biodiesel (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

2.4.1 Imobilização enzimática

Na primeira conferência de engenharia de enzimas que ocorreu em Henniker, NH, USA, em 1971, a definição de imobilização de biocatalizadores, enzimas ou células foi determinada como: fixas fisicamente numa região definida para catalisar uma reação específica sem perda da atividade catalítica, possibilitando consecutivos usos (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015). A imobilização de enzimas em suportes não solúveis tem sido um tópico ativo de pesquisas há décadas e possibilita não somente a reutilização da enzima como também a modulação das suas propriedades catalíticas. Através da imobilização covalente de cada molécula da enzima aos variados grupos ativados do suporte, é possível atingir um alto grau de estabilização enzimática e interferir nas propriedades catalíticas da enzima, como pH ótimo, temperatura ótima, ação de inibidores e cinética (LIU et al., 2013).

Enzimas imobilizadas apresentam estabilidade marcante, que rende uma maior aplicabilidade para produção industrial. Essas características encorajam o desenvolvimento de novas abordagens na imobilização de enzimas em diferentes suportes (LI; DING; ZHOU, 2013). A superfície à qual a enzima será imobilizada possui diversas propriedades que podem influenciar na manutenção da estrutura enzimática e retenção de sua atividade pela formação de complexos de transição eletrônica ou pela formação de ligações covalentes e pontes de hidrogênio com a matriz (MOHAMAD et al., 2015).

2.5 NANOMATERIAIS

A redução das dimensões do suporte de imobilização enzimática tem demonstrado promover um aumento na atividade do derivado enzimático devido ao aumento de sua mobilidade no substrato, associações de indução de curvatura e confinamento espacial. Além da estrutura e regularidade da topografia do suporte também estar associado a retenção da atividade

enzimática. Dependendo do tipo da enzima, partículas esféricas tem demonstrado maior retenção estrutural (TALBERT; GODDARD, 2012).

Nas últimas décadas, o grande interesse em nanotecnologia promoveu um desenvolvimento das nanoestruturas com potencial para aplicações nas áreas biotecnológica, de imunossensores e biomédica. Diversas enzimas já foram imobilizadas em nanoestruturas, como esferas, fibras e tubos. Uma grande diversidade de materiais são utilizadas como suporte, cada uma com características, vantagens e desvantagens, assim como membranas, superfícies de carbono, materiais monolíticos, polímeros, sílica e híbridos. Além disso, modificações dessas estruturas por moléculas de enzimas e biomembranas propicia biofuncionalidade única. As imobilizações enzimáticas em nanoestruturas atingem grande retenção de atividade e ótima capacidade de detecção. A utilização de nanomateriais como suporte para imobilização está fundamentada na redução das limitações de difusão e maximização da área de superfície para funcionalização, aumentando a quantidade de enzima imobilizada. Essas características impactam diretamente na capacidade catalítica do derivado. Nos últimos anos, diversos tipos de nanopartículas foram aplicadas como superfície de imobilização, inclusive nanopartículas magnéticas (ANSARI; HUSAIN, 2012; JIANG et al., 2012).

2.5.1 Nanopartículas Magnéticas

Partículas magnéticas surgiram como uma nova plataforma promissora aplicações biomédicas, tais como suporte para imobilização de proteínas e enzimas, imagem por ressonância magnética, hibridação e detecção de DNA, entre outros. (ZHU et al., 2016). Elas apresentam apelo devido à sua facilidade de captura e substituição do meio (SUN et al., 2012). Hoje em dia, enzimas imobilizadas em superfícies magnéticas vem sendo preferidas às enzimas livres para aplicações industriais. Através de aparatos simples é possível separá-las do meio com rapidez e facilidade, sem necessidade de centrifugação, diluição indesejável e perda de material durante lavagens em comparação aos suportes não magnéticos. Por isso, métodos de separação magnéticos vem ficando mais comuns entre diferentes áreas das biociências (TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012).

Para melhorar a estabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade, as nanopartículas podem ser modificadas por materiais orgânicos ou inorgânicos, tais como polímeros, biomoléculas, sílica, metais e outros (ZHU et al., 2016). Diversas partículas e suportes magnéticos, como as microesferas, e vários biomateriais encapsulando partículas magnéticas e copolímeros conjugados a partículas magnéticas apresentaram bons resultados. A associação entre partículas em nano-escala com materiais de propriedades magnéticas promove uma maior área superficial e especificidade à enzima imobilizada, com facilidade de recuperação e aumento da estabilidade. Além de menor resistência de transferência e menor custo operacional (ANSARI; HUSAIN, 2012).

2.6 PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS

A caracterização funcional e estrutural de proteínas, é a principal motivação para o desenvolvimento de diversas metodologias de purificação de proteínas. Vários fatores influenciam no processo de purificação, como ocorrência de proteína de interesse complexada ou individual, quantidade de proteínas presentes em sistemas biológicos e as propriedades físico-químicas das proteínas, incluindo a sequência primária, valores isoelétricos, solubilidade, tamanho ou massa molecular relativa, a carga e hidrofobicidade. Todos esse fatores podem influenciar na função da proteína alvo e são considerados críticos durante a aplicação dos métodos de purificação. A eficácia da purificação, por sua vez, é indicada através da quantidade e também a qualidade das proteínas purificadas. A qualidade é avaliada através da caracterização funcional, biofísica e bioquímica (GUNDA et al., 2014).

A purificação de várias proteínas tradicionalmente envolve aplicação de solventes orgânicos ou sais para precipitação, seguida de técnicas cromatográficas incluindo normalmente gel filtração e troca iônica ou hidrofobicidade ou afinidade (NAM; WALSH; YANG, 2016). A cromatografia de coluna, considerada o padrão ouro dos métodos de purificação, é baseada nas características das partículas da resina utilizada, em relação a carga, hidrofobicidade e afinidade aos ligantes para separar proteínas e outras moléculas. Utilizando métodos cromatográficos, várias proteínas podem ser

purificadas à alto grau de pureza, porém, resinas cromatográficas apresentam altos custos e dificuldade de aplicação em larga escala (KIM; CHEN, 2016).

2.6.1 Purificação por partículas magnéticas

Partículas magnéticas vem se tornado amplamente utilizadas em processos de separação e purificação com sucesso, rapidez e facilidade de aplicação em larga escala, principalmente para amostras biológicas (MIRAHMADI-ZARE et al., 2016). Diversas partículas com diferentes materiais já foram sintetizadas como adsorventes de proteínas de interesse. Já a separação por campo magnético substitui a filtração ou centrifugação necessária para separação das partículas não magnéticas, devido a sua facilidade e rapidez, por não requerer equipamentos caros ou específicos (CHEN; LIN; JIA, 2015).

Revestimentos de proteção dessas partículas não só estabilizam a partícula como podem ser utilizados para funcionalização de sua superfície. Diversas substâncias são utilizadas para criar uma superfície específica para que a molécula alvo seja facilmente capturada (AYGAR et al., 2015). Existem diversos peptídeos e proteínas que apresentam elevada afinidade por diferentes grupamentos funcionais ou estruturais que podem estar presentes na partícula sintetizada. Além disso, outra estratégia seria utilizar ligantes previamente imobilizados na partícula que tenham afinidade pela proteína alvo, como anticorpos (BARBOSA et al., 2015), o que aumenta os custos do processo de purificação.

3 METODOLOGIA

3.1 MICRO-ORGANISMO

O microrganismo utilizado foi o fungo filamentoso da espécie *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622, obtido da Coleção da Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco. O fungo foi mantido em ágar extrato de malte esterilizado e o meio utilizado para produção da enzima fibrinolítica será o meio de soja (MS) (Lima et al., 2011).

3.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA

Foi realizada fermentação submersa em frascos do tipo Erlenmeyer contendo meio de soja (MS). A padronização do inóculo foi feita através da adição de uma solução salina 0,9% e Tween 80 a 0,01% à colônia crescida a 28 °C durante 5 dias. A suspensão de esporos contada em câmara de Neubauer e inoculada a uma concentração de 10^6 esporos/mL. A fermentação foi realizada à 24 °C por 72 horas, sob agitação constante.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DA PROTEASE

A metodologia de síntese de nanopartículas foi modificada e otimizada para a protease utilizada. Em 50 mL de água destilada foram adicionados 5 mL de 1,1 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,6 M de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, adicionou-se 5,0 M NaOH gota a gota, sob agitação, até atingir pH 10, quando se produziram precipitados de partículas negras. Em seguida, a temperatura da mistura foi aumentada até 50 °C e mantida durante 30 min com agitação vigorosa. As partículas magnéticas obtidas foram cuidadosamente lavadas com água destilada até atingir pH 7. Elas foram sempre coletadas sob campo magnético ao longo deste trabalho. Este material foi seco a 50 °C, pulverizado e mantido a 25 °C.

0,5 g de nanopartículas magnéticas foram adicionadas a 50 ml de solução KMnO_4 0,1 M a 25 °C durante 1 h. Após lavagem com água destilada, as nanopartículas magnéticas com KMnO_4 foram imersas em 50 mL de solução de anilina 0,5 M preparada em HNO_3 1,0 M. A polimerização ocorreu a 4 °C durante 1 hora e as nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina (mPANI) foram sucessivamente lavadas com água destilada, 0,1 M de ácido

cítrico e novamente com água destilada. Finalmente, o mPANI foi seco a 50 °C e mantido a 25 °C até utilização.

As nanopartículas de mPANI foram ativadas com solução de glutaraldeído a 2% (v/v) durante diferentes tempos (1 a 12 horas) e lavadas 10 vezes com água destilada. As nanopartículas magnéticas ativadas foram lavadas três vezes com tampão Tris-HCl 0,2 M (pH 5,5-9) e misturadas com a solução enzimática parcialmente purificada (100 a 300 µg/mL) para imobilização (1 a 3 horas). Em seguida, as nanopartículas foram incubadas com solução de glicina 0,1M por 30 min e lavadas duas vezes com água destilada. As lavagens foram usadas para medir proteínas não ligadas. A atividade residual foi determinada como a razão da atividade na protease parcialmente purificada para a presente na protease imobilizada e expressa em percentagem.

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

A imobilização da protease em nanopartículas de mPANI foi estabelecida usando um planejamento fatorial completo (FFD) usando os quatro parâmetros a seguir: tempo de ativação de nanopartículas, quantidade de proteína, pH e tempo de imobilização, enquanto a resposta foi atividade residual (RA) expressa em porcentagem da atividade enzimática imobilizada considerando a atividade enzimática livre como 100%. O delineamento experimental foi composto por 16 corridas e 4 repetições no ponto central, necessárias para calcular o erro puro. Os valores experimentais e previstos foram comparados e validados com o Statistica 8.0 (Statsoft: Tulsa, Oklahoma, EUA).

3.5 OTIMIZAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE PROTEASE VIA RSM

Para otimizar a imobilização de protease, a quantidade de proteína oferecida e tempo de imobilização foram fixados no melhor valor encontrado no FFD: 200 µg / mL e 2 h, respectivamente, enquanto os níveis dos outros dois fatores (pH e tempo de ativação) variou de acordo com um desenho composto central 2² (CCD). Os níveis deste design também foram escolhidos com base no FFD. Para simplificar, os pontos estrelas foram arredondados em relação

aos valores teóricos determinado. Os valores experimentais e previstos foram comparados pelo Statistica 8.0 (Statsoft).

3.6 PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DA PROTEASE

O método de purificação utilizou nanopartículas magnéticas ativadas com glutaraldeído para imobilizar a caseína comercial, substrato da enzima de interesse, para realizar uma forma de cromatografia de afinidade. A imobilização seguiu a metodologia otimizada para imobilização da protease.

Após realização da fermentação do fungo e produção da enzima, foram adicionadas as nanopartículas magnéticas para isolamento da protease. O fermentado ficou em contato com as nanopartículas por 20 min, a 4 °C, sob agitação constante. Em seguida foi induzido um campo magnético que promoveu o resgate das nanopartículas. Foram realizadas lavagens com tampão Tris-HCl 0,2 M e Solução salina de NaCl 0,1M. Solução salina de NaCl 1M foi adicionada às partículas resgatadas para liberar as enzimas aduzidas. Posteriormente, foi aplicado novamente o campo magnético para separar as partículas da solução contendo a enzima de interesse. A suspensão enzimática foi, então, dialisada e estocada.

3.7 CONCENTRAÇÃO PROTEICA E ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A concentração de proteínas foi medida utilizando o método de Smith *et al.* (1985), utilizando a soroalbumina bovina como padrão. A determinação da atividade proteásica foi realizada de acordo com a metodologia de Leighton *et al.* (1976) utilizando a azocaseína a 1%(p/v) como substrato.

3.8 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E REUSO

SDS-PAGE foi realizado segundo Laemmli (1970) após a purificação da enzima para determinar o grau de pureza da amostra. A coloração das proteínas foi realizada utilizando Coomassie Blue R-250 e Nitrato de Prata.

O efeito do pH na atividade foi avaliado utilizando substrato específico em vários tampões em diferentes pHs, à 37 °C, por 120 minutos, sendo retiradas amostras a cada 30 min. Já o efeito da temperatura na atividade foi avaliado utilizando a solução de substrato em diferentes temperaturas (25°C, 30°C, 40°C, 50°C, 60°C e 70°C) por 60 min e a estabilidade térmica a enzima

foi pré-incubada em temperaturas entre 25°C e 70°C, por 120 minutos, retirando-se amostras a cada 30 min.

A atividade enzimática foi testada em presença e ausência inibidores de proteases de acordo com o protocolo descrito por Dunn, em presença de inibidor de serino-proteases (PMSF), inibidor de metalo-protease (EDTA) e inibidor de proteases de cisteína (ácido iodoacético) numa concentração final de 10 mM.

A enzima imobilizada foi usada repetidamente e a primeira atividade foi comparada com as subsequentes. Para medir a quantidade de nanopartículas perdidas durante as lavagens de reutilização, as nanopartículas recuperadas foram secas (50 ° C por 24 horas) e pesadas após cada uso.

3.9 PREPARAÇÃO DE HIDROLISADOS DE CASEÍNA

Caseína comercial de leite bovino, Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), foi dissolvida em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 9) a 1% (p / v). Um total de 10 mg de derivado, enzima imobilizada usando condições ótimas, foi adicionado em tubos de 1,5 mL contendo 1 mL de solução de caseína. Os tubos de reação foram incubados a 37 ° C em banho-maria. A hidrólise foi conduzida para ocorrer durante 2,3 horas e os tubos foram recolhidos a 5, 15, 25, 35, 45, 65, 95, 125 e 155 min. Um tubo controle foi coletado logo após a adição do derivado. Todos os tubos tiveram o derivado removido para parar a hidrólise. Finalmente, os hidrolisados foram liofilizados e armazenados a ~ 18 °C para uso posterior.

3.10 PMF E SEQUENCIAMENTO DOS PEPTÍDEOS

A Impressão Digital de Massa peptídica (PMF) foi obtida por espectrometria de massas, utilizando um espectrômetro de massa de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF) Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), equipado com Laser Nd: YAG (355 nm). Os hidrolisados foram misturados com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico - HCCA (10 mg / mL) em acetonitrilo a 50% e ácido trifluoroacético a 0,3%. Os espectros de massa foram obtidos em modo reflexivo positivo com tensão de aceleração de 19 kV e laser a 100 Hz. O intervalo de detecção foi definido para m / z 700–4,480. A fragmentação dos íons parentais foi realizada no modo LIFT

e a calibração externa com mistura padrão de peptídeos (Bruker Daltonics). Os dados foram analisados usando o FlexControl 3.0 (Bruker Daltonics), e os espectros foram processados usando o FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics). As sequências encontradas foram comparadas com as sequências do banco de dados de proteínas do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3.11 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade sequestradora do radical 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico) (ABTS) foi medida usando o método descrito por Re *et al.* usando 7 mM de solução ABTS e 140 mM de solução de persulfato de potássio. A solução de trabalho foi preparada pela mistura de 5 mL de solução ABTS com 88 mL de solução de persulfato de potássio e permitindo-lhes reagir durante 10 horas à temperatura ambiente no escuro. A solução foi então diluída misturando 1 mL de solução de trabalho ABTS com aproximadamente 50 mL de etanol em para obter uma absorvência de 0,7 unidades a 734 nm. A solução fresca de ABTS foi preparada diariamente. Amostra (30 mL) com diferentes concentrações (1, 0,5 e 0,1%, w / v) foi misturada com 3 mL de solução de trabalho ABTS e a mistura foi deixada por 5 min a 25 ° C no escuro, a mesma solução de trabalho ABTS com água destilada foi usada como amostra em branco e a caseína não hidrolisada foi usada como amostra de referência. A absorvência foi então medida a 734 nm. Uma curva padrão de Trolox variando de 100 a 1.500 µM foi preparada. A atividade foi expressa em equivalente à µmol Trolox (TE) / mg de amostra.

A atividade sequestradora de peróxido de hidrogênio foi testada de acordo com o método de Kittiphattanabawon *et al.* Um total de 850 µL da amostra foi misturado com 150 µL de peróxido de hidrogênio 43 mM em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4. Após 5 min de reação a 25 ° C, a absorvência foi registrada a 230 nm. Usamos o mesmo tampão fosfato como amostra em branco sem peróxido de hidrogênio e, também, caseína não hidrolisada como amostra de referência. Trolox (0-10 mM) foi usado como padrão. A atividade foi expressa em equivalente à µmol Trolox (TE) / mg de amostra.

4 RESULTADOS

4.1 OPTIMIZATION OF *PENICILLIUM AURANTIOWISEUM* PROTEASE IMMOBILIZATION ON MAGNETIC NANOPARTICLES FOR ANTIOXIDANT PEPTIDES' OBTAINMENT.

Publicado na revista: Preparative Biochemistry and Biotechnology, DOI: 10.1080/10826068.2017.1292286 (fig. 2).

PREPARATIVE BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY
https://doi.org/10.1080/10826068.2017.1292286



Optimization of *Penicillium aurantiowiseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment

José Manoel Wanderley Duarte Neto^a, Jackeline da Costa Maciel^a, Júlia Furtado Campos^b, Luiz Bezerra de Carvalho Junior^{a,c}, Daniela Araújo Viana Marques^d, Carolina de Albuquerque Lima^a, and Ana Lúcia Figueiredo Porto^{a,d}

^aKeizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil; ^bNortheastern strategic technology center (CETENE), Recife, PE, Brazil; ^cBiochemistry Department, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife, PE, Brazil; ^dUniversity of Pernambuco, Serra Talhada Campus, Serra Talhada, PE, Brazil; ^eFaculty of Science, Education and Technology of Garanhuns, University of Pernambuco, Garanhuns, PE, Brazil

ABSTRACT

This work reports an optimization of protease from *Penicillium aurantiowiseum* immobilization on polyaniline-coated magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment derived from bovine casein. Immobilization process was optimized using a full two-level factorial design (2⁴) followed by a response surface methodology. Using the derivative, casein was hydrolyzed uncovering its peptides that were sequenced and had antioxidant properties tested through (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt) (ABTS) radical scavenging and hydrogen peroxide scavenging assays. Optimal conditions for immobilization were 2 hr of immobilization, offered protein amount of 200 µg/mL, immobilization pH of 6.3 and 7.3 hr of activation. Derivative keeps over 74% of its original activity after reused five times. Free and immobilized enzyme casein hydrolysates presented similar peptide mass fingerprints, and prevalent peptides could be sequenced. Hydrolysates presented more than 2.5× higher ROS scavenging activity than nonhydrolyzed casein, which validates the immobilized protease capacity to develop casein-derived natural ingredients with potential for functional foods.

KEYWORDS

Bioactive peptides; functional foods; mass spectrometry analysis; protease immobilization; response surface methodology

Figura 2. Primeira página do artigo 1, intitulado Optimization of *Penicillium aurantiowiseum* protease immobilization on magnetic nanoparticles for antioxidant peptides' obtainment.

Espécies reativas de oxigênio (ERO), são normalmente produzidas durante o metabolismo de organismos vivos. EROs envolvem uma variedade de radicais livres e alguns radicais não-livres, que, quando em excesso, estão envolvidos em diversas desordens, como diabetes, inflamações crônicas, hipertensão, envelhecimento e câncer. Além disso, em alimentos, produtos oxidativos e radicais livres podem ser produzidos pela oxidação de lipídios. Assim, uma variedade de antioxidantes é utilizada como aditivos de alimentos. Esses aditivos possuem riscos à saúde se consumidos em excesso, além de possuírem alto custo. Por isso, aditivos antioxidantes naturais, vem ganhando a atenção da indústria, como os peptídeos antioxidantes.

Esses peptídeos podem ser obtidos da hidrólise da caseína, uma proteína alimentar disponível em grande quantidade com alto grau de pureza e baixo custo no mercado. Na hidrólise, ocorre a liberação dos peptídeos através da quebra das ligações peptídicas da proteína. Essa quebra é catalisada por proteases, as principais enzimas industriais. Essas enzimas podem ser obtidas de diversas fontes, como os fungos. O *Penicillium aurantiogriseum* é um fungo de baixas necessidades nutricionais, de fácil cultivo e produtor de protease alcalina extracelular capaz de hidrolisar diferentes proteínas, características interessantes para aplicação em processos industriais.

Essas enzimas podem ser frágeis e facilmente desnaturadas, aumentando os custos operacionais. Através do método de imobilização de enzimas, é possível aumentar a resistência, aplicabilidade e viabilidade de processos industriais, diminuindo custos. Nesse contexto, esse artigo trata da otimização da imobilização da protease produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum* em nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina para obtenção de peptídeos antioxidantes obtidos da caseína bovina. O processo de imobilização foi otimizado através de um planejamento factorial completo (2^4) seguido de metodologia de superfície de resposta (MSR).

Utilizando o derivado gerado pela imobilização, a caseína bovina foi hidrolisada liberando peptídeos que foram sequenciados e apresentaram propriedades antioxidantes, testadas através dos métodos de sequestro de radicais ABTS e de peróxido de hidrogênio. As condições ótimas do processo de imobilização obtidas pela otimização foram: 7,3 horas de ativação das partículas utilizando glutaraldeído; 2 horas de imobilização; utilizando 200 µg/mL de protease; em pH 6,3. O derivado imobilizado conseguiu manter 74% de sua atividade original após 5 reutilização consecutivas.

O padrão de massa dos peptídeos gerados (peptide mass fingerprint) pela hidrólise da caseína utilizando a protease livre e imobilizada, foram muito semelhantes e os peptídeos em maior concentração foram sequenciados, utilizando o MALDI-TOF. Em testes de oxidação, hidrolizados da caseína apresentaram 2,5 vezes maior atividade sequestradora de radicais livres do que a caseína não hidrolisada. O processo de imobilização da protease apresentou potencial na obtenção de ingredientes naturais de caseína com propriedades antioxidantes, interessantes para desenvolvimento de alimentos funcionais.

4.2 SINGLE STEP PURIFICATION VIA MAGNETIC NANOPARTICLES OF NEW BROAD PH ACTIVE PROTEASE FROM *PENICILLIUM AURANTIOWRISEUM*.

Publicado na revista: Protein Expression and Purification, DOI: 10.1016/j.pep.2018.01.016 (fig. 3).

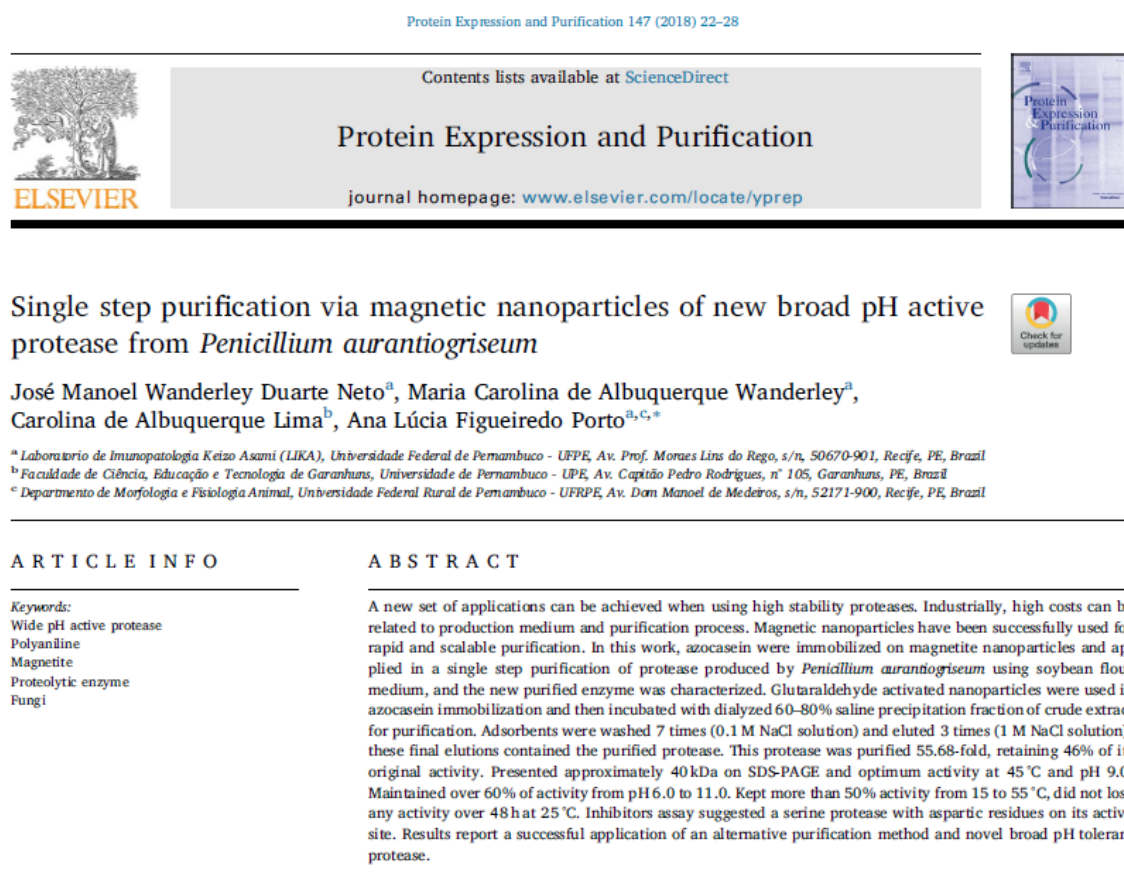


Figura 3. Primeira página do artigo 2, intitulado Single step purification via magnetic nanoparticles of new broad pH active protease from *Penicillium aurantiowriseum*.

Proteases possuem grande diversidade de aplicações industriais e, em conjunto, constituem o maior e mais importante grupo de enzimas industriais. Essa amplitude de aplicações tem motivado a pesquisa por novas proteases com diferentes proteases que possam favorecer o desenvolvimento de novos processos, produtos e armazenamento. Uma nova gama de aplicações pode ser alcançada quando se utiliza proteases com atividade num amplo espectro de pH e temperatura numa variedade de áreas industriais, o que aumenta a procura por enzimas tolerantes às condições do meio.

Industrialmente, os altos custos da produção de enzimas estão relacionados ao meio de cultura e processo de purificação. Tradicionalmente, os métodos de purificação eventualmente envolvem passos de centrifugação, precipitação salina, ultrafiltração, sucessivos passos cromatográficos, diálises e concentração do produto final. Esses múltiplos passos consomem tempo, dificultam a aplicação em larga escala e requerem reagentes e equipamentos caros, resultando em aumento de custos. A principal estratégia de purificação utilizando resinas cromatográficas de afinidade podem dificultar a mudança de escala, devido aos altos custos.

Nanopartículas magnéticas vem sendo utilizadas com sucesso em processos de purificação rápidos e passíveis de utilizar em escala industrial. Nesse artigo relata-se a utilização de azocaseína imobilizada em nanopartículas magnéticas para aplicação num processo em etapa única de purificação da protease produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum* utilizando meio de farinha de soja. Além da caracterização dessa enzima como nova protease ativa em amplo espectro de pH.

Nanopartículas magnéticas ativadas via glutaraldeído foram utilizadas na imobilização de azocaseína e incubadas, para purificação, com a solução concentrada do extrato bruto do fungo, precipitada com sulfato de amônio 60-80 % de saturação e dialisada. Após o contato das partículas com o extrato concentrado, as partículas com a enzima adsorvida foram lavadas 7 vezes com solução de NaCl 0,1 M e, em seguida, a enzima foi eluída utilizando solução de NaCl 1 M por três vezes, essas duas primeiras eluições contém a protease purificada. A protease foi purificada 55,68 vezes, com uma retenção de 46% da sua atividade original. Em SDS-PAGE, a protease apresentou aproximadamente 40 kDa e, em teste de atividade, apresentou pH ótimo 9,0 e temperatura ótima próximo de 45 °C. A protease manteve sua atividade acima de 60% da atividade em pH ótimo numa faixa de pH de 6,0 a 11,0. Manteve, também, acima de 50% da atividade de 15 a 55 °C, além de não perder nenhuma atividade após 48 horas à 25 °C. Em teste de inibidores, o PMSF inibiu completamente a atividade enquanto que a Pepstatina A inibiu mais de 50% da atividade, sugerindo uma serino-protease com resíduo aspártico.

Os resultados comprovaram a eficácia do método alternativo, e mais barato, de purificação da protease utilizando a azocaseína imobilizada nas

nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina. A protease demonstrou significativos resultados de atividade, estabilidade, facilidade de purificação e baixo custo de produção, os quais são promissores para diversas aplicações industriais e reportam uma nova linhagem fúngica produtora de protease tolerante à amplo espectro de pH, o que contribui para o conhecimento da biodiversidade dos fungos produtores do Brasil.

5 CONCLUSÃO

A protease produzida pelo *Penicillium aurantiogriseum* foi imobilizada com sucesso nas nanopartículas magnéticas revestidas com polianilina, o derivado foi caracterizado e utilizado na liberação de peptídeos antioxidantes de caseína bovina comercial. O *pool* de peptídeos apresentou atividade sequestradora de espécies reativas de oxigênio e os peptídeos presentes em maior quantidade foram sequenciados via MALDI-TOF. O mesmo suporte foi utilizado na imobilização de azocaseína e o derivado foi utilizado para purificação da protease produzida pelo *P. aurantiogriseum*, de forma rápida e barata. A protease purificada foi caracterizada e apresentou atividade em amplo espectro de pH e alta estabilidade, características de interesse para diversos processos industriais. Com os resultados dessa tese, foi possível estudar as propriedades dessa nova enzima com uma gama de potencial aplicabilidades.

REFERÊNCIAS

ABIDI, F. et al. MS Analysis and Molecular Characterization of *Botrytis cinerea* Protease Prot-2. Use in Bioactive Peptides Production. **Applied biochemistry and biotechnology**, 15 mar. 2013.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 512–23, 2012.

AYGAR, G. et al. Preparation of silica coated cobalt ferrite magnetic nanoparticles for the purification of histidine-tagged proteins. **Journal of Physics and Chemistry of Solids**, v. 87, p. 64–71, 2015.

BARBOSA, O. et al. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 435–456, 2015.

BOUACEM, K. et al. Biochemical characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Caldicoprobacter guelmensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 299–307, 2015.

CHEMICAL WEEKLY. Enzymes market is expected to reach \$5.4 bn, worldwide, by 2020. **Focus on Catalysts**, v. 2015, n. 11, p. 3, 2015.

CHEN, J.; LIN, Y.; JIA, L. Preparation of anionic polyelectrolyte modified magnetic nanoparticles for rapid and efficient separation of lysozyme from egg white. **Journal of Chromatography A**, v. 1388, p. 43–51, 2015.

CRUZ, R. et al. Diversity of *Penicillium* in soil of Caatinga and Atlantic Forest areas of Pernambuco, Brazil: An ecological approach. **Nova Hedwigia**, v. 97, n. 3–4, p. 543–556, 2013.

DADSHAHI, Z. et al. Extraction and purification of a highly thermostable alkaline caseinolytic protease from wastes *Litopenaeus vannamei* suitable for food and detergent industries. **Food Chemistry**, v. 202, p. 110–115, 2016.

EŞ, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, n. 5, p. 2065–2082, 2015.

FERREIRA, J. A. et al. Waste biorefineries using filamentous ascomycetes fungi: Present status and future prospects. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 334–345, 2016.

GRAMINHO, E. R. et al. Purification, characterization, and specificity determination of a new serine protease secreted by *Penicillium waksmanii*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 169, n. 1, p. 201–14, jan. 2013.

GUNDA, V. et al. Developments in purification methods for obtaining and evaluation of collagen derived endogenous angioinhibitors. **Protein Expression and Purification**, v. 94, p. 46–52, 2014.

HAQUE, E.; CHAND, R.; KAPILA, S. Biofunctional Properties of Bioactive Peptides of Milk Origin. **Food Reviews International**, v. 25, n. 1, p. 28–43, 2008.

HARTMANN, R.; MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 163–169, 2007.

HSIAO, N. W. et al. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus Oryzae* protease extract, peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 89–94, 2014.

IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. BIOSYNTHESIS OF ACID PROTEASES BY *PENICILLIUM GRISEOROSEUM* IH-02 IN SOLID-STATE FERMENTATION. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 7, p. 2717–2724, 2007.

JIANG, B. et al. Hydrophilic immobilized trypsin reactor with magnetic graphene oxide as support for high efficient proteome digestion. **Journal of chromatography. A**, v. 1254, n. null, p. 8–13, 7 set. 2012.

KIM, H.; CHEN, W. A non-chromatographic protein purification strategy using Src 3 homology domains as generalized capture domains. **Journal of Biotechnology**, v. 234, p. 27–34, 2016.

KUNDA, P. B. et al. Identification of bioactive peptides in a functional yogurt by micro liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry assisted by retention time prediction. **Journal of chromatography. A**, v. 1229, p. 121–8, 16 mar. 2012.

LI, D.; DING, H.; ZHOU, T. Covalent Immobilization of Mixed Proteases, Trypsin and Chymotrypsin, onto Modified Polyvinyl Chloride Microspheres. 2013.

LIMA, C. A. et al. Production and Characterization of a Collagenolytic Serine Protease by *Penicillium aurantiogriseum* URM 4622: A Factorial Study. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2011.

LIU, Q. et al. Covalent immobilization of hydroperoxide lyase on chitosan hybrid hydrogels and production of C6 aldehydes by immobilized enzyme. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 95, p. 89–98, nov. 2013.

LUND, F.; FRISVAD, J. C. Chemotaxonomy of *Penicillium aurantiogriseum* and related species. **Mycological Research**, v. 98, n. 5, p. 481–492, maio 1994.

MENEZES, R. et al. Biogeochemical cycling in terrestrial ecosystems of the Caatinga Biome. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 3, p. 643–653, 2012.

MIRAHMADI-ZARE, S. Z. et al. Super magnetic nanoparticles NiFe_2O_4 , coated with aluminum-nickel oxide sol-gel lattices to safe, sensitive and selective purification of his-tagged proteins. **Protein Expression and Purification**, v. 121, p. 52–60, 2016.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220,

2015.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health – A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, n. 5, p. 577–583, 2016.

MOONEY, C. et al. PeptideLocator: Prediction of Bioactive Peptides in Protein Sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, p. 1–7, 16 mar. 2013.

MURO URISTA, C. et al. Review: Production and functionality of active peptides from milk. **Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional**, v. 17, n. 4, p. 293–317, ago. 2011.

NAM, S. H.; WALSH, M. K.; YANG, K. Y. Comparison of four purification methods to purify cysteine protease from Asian pear fruit (*Pyrus pyrifolia*). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 5, p. 86–93, 2016.

OLIVEIRA, L. G. et al. Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area, Pernambuco, Brazil. **Journal of Arid Environments**, v. 95, p. 49–54, 2013.

ONIONS, A. H. S.; BRADY, B. L. Taxonomy of *Penicillium* and *Acremonium*. In: **Penicillium and Acremonium**. Boston, MA: Springer US, 1987. p. 1–36.

OZTURKOGLU-BUDAK, S. et al. Protease and lipase activities of fungal and bacterial strains derived from an artisanal raw ewe's milk cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 237, p. 17–27, nov. 2016.

PACCHIONI, R. G. et al. Taxonomic and functional profiles of soil samples from Atlantic forest and Caatinga biomes in northeastern Brazil. **MicrobiologyOpen**, v. 3, n. 3, p. 299–315, 2014.

PIHLANTO, A. Lactic Fermentation and Bioactive Peptides. **Lactic Acid Bacteria – R & D for Food, Health and Livestock Purposes**, n. Cvd, 2013.

RODRIGUES, P. M. B. et al. Production and characterization of protease from *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. In: TEIXEIRA, J. A. (Ed.). **Valnura – A Europe-Latin America Post-Graduate Research Network in the Valorization of Natural Research**. [s.l.] Gráfica Pacense, 2008. p. 95–104.

ROGERS, L. D.; OVERALL, C. M. Proteolytic post-translational modification of proteins: Proteomic tools and methodology. **The American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 2013.

ROSSO, B. U. et al. Partitioning and extraction of collagenase from *Penicillium aurantiogriseum* in poly(ethylene glycol)/phosphate aqueous two-phase system. **Fluid Phase Equilibria**, v. 335, p. 20–25, dez. 2012.

RYDER, K. et al. Towards generation of bioactive peptides from meat industry waste proteins: Generation of peptides using commercial microbial proteases. **Food Chemistry**, v. 208, p. 42–50, 2016.

SEN, S. K. et al. Thermostable amylase production from hot spring isolate *Exiguobacterium* sp: A promising agent for natural detergents. **Sustainable**

Chemistry and Pharmacy, v. 3, p. 59–68, 2016.

SIRITAPETAWE, J. et al. A novel serine protease with human fibrino(geno)lytic activities from *Artocarpus heterophyllus* latex. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1824, n. 7, p. 907–912, 2012.

STUBIGER, G. et al. Characterization of Yeasts and Filamentous Fungi using MALDI Lipid Phenotyping. **Journal of Microbiological Methods**, v. 130, p. 27–37, 2016.

SUN, L. et al. High efficiency and quantitatively reproducible protein digestion by trypsin-immobilized magnetic microspheres. **Journal of chromatography. A**, v. 1220, p. 68–74, 13 jan. 2012.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Enzymes on material surfaces. **Colloids and surfaces. B, Biointerfaces**, v. 93, p. 8–19, 1 maio 2012.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1–11, jun. 2013.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. α -Amylase immobilization onto dye attached magnetic beads: Optimization and characterization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 16–23, jun. 2012.

ZHU, X. et al. Efficient purification of lysozyme from egg white by 2-mercapto-5-benzimidazolesulfonic acid modified Fe₃O₄/Au nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 59, p. 213–217, 2016.

APÊNDICE A - COLLAGENOLYTIC ENZYMES PRODUCED BY FUNGI: A
SYSTEMATIC REVIEW, PUBLICADO NA REVISTA BRAZILIAN JOURNAL
OF MICROBIOLOGY, DOI: 10.1016/J.BJM.2016.08.001

BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY 48 (2017) 13–24



BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY

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



Review

Collagenolytic enzymes produced by fungi: a
systematic review



Maria Carolina de Albuquerque Wanderley^a, José Manoel Wanderley Duarte Neto^a,
José Luiz de Lima Filho^a, Carolina de Albuquerque Lima^b, José Antônio Couto Teixeira^c,
Ana Lúcia Figueiredo Porto^{d,*}

^a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Recife, PE, Brasil

^b Universidade de Pernambuco (UPE), Faculdade de Ciências, Educação e Tecnologia de Garanhuns, Garanhuns, PE, Brasil

^c Universidade do Minho (UMinho), Centro de Engenharia Biológica, Braga, Portugal

^d Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, PE, Brasil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 December 2015

Accepted 15 August 2016

Available online 30 September 2016

Associate Editor: Adalberto Pessoa Jr

Keywords:

Collagenase

Fungus

Characterization

Purification

Production

ABSTRACT

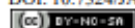
Specific proteases capable of degrading native triple helical or denatured collagen have been required for many years and have a large spectrum of applications. There are few complete reports that fully uncover production, characterization and purification of fungi collagenases. In this review, authors searched through four scientific on line data bases using the following keywords (collagenolytic OR collagenase) AND (fungi OR fungus OR fungal) AND (production OR synthesis OR synthesise) AND (characterization). Scientific criteria were adopted in this review to classify found articles by score (from 0 to 10). After exclusion criteria, 21 articles were selected. None obtained the maximum of 10 points defined by the methodology, which indicates a deficiency in studies dealing simultaneously with production, characterization and purification of collagenase by fungi. Among microorganisms studied the non-pathogenic fungi *Penicillium aurantiogriseum* and *Rhizoctonia solani* stood out in volumetric and specific collagenase activity. The only article found that made sequencing of a true collagenase showed 100% homology with several metalloproteinases fungi. A clear gap in literature about collagenase production by fungi was verified, which prevents further development in the area and increases the need for further studies, particularly full characterization of fungal collagenases with high specificity to collagen.

© 2016 Sociedade Brasileira de Microbiologia. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Corresponding author at: Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900 Recife, PE, Brazil.

APÊNDICE B - PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF COLLAGENASE BY *PENICILLIUM* SP. UCP 1286 ISOLATED FROM CAATINGA SOIL, PUBLICADO NA REVISTA JOURNAL OF APPLIED BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, DOI: 10.7324/JABB.2016.40401

Journal of Applied Biology & Biotechnology Vol. 4 (04), pp. 001-010, July-August, 2016
Available online at <http://www.jabonline.in>
DOI: 10.7324/JABB.2016.40401



Production and Characterization of Collagenase by *Penicillium* sp. UCP 1286 Isolated From Caatinga Soil

Maria Carolina de Albuquerque Wanderley^{1,2}, Jose Manoel Wanderley Duarte Neto², Carolina de Albuquerque Lima³, Sara Isabel da Cruz Silverio⁴, Jose Luiz de Lima Filho², Jose Antonio Couto Teixeira⁴, Ana Lucia Figueiredo Porto^{5*}

¹ Department of Molecular Sciences, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

² Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Lima do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brazil.

³ Faculty of Science, Education and Technology of Garanhuns, University of Pernambuco-UPE, Av. Capitão Pedro Rodrigues, nº 105, Garanhuns, PE, Brazil.

⁴ Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal. ⁵ Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil.

ARTICLE INFO

Article history:

Received on: 14/06/2016

Revised on: 14/07/2016

Accepted on: 30/07/2016

Available online: 26/08/2016

Key words:

Collagenolytic; Enzymes;

Factorial Design;

Fermentation; Filamentous

Fungi; Specificity.

ABSTRACT

A new *Penicillium* sp. strain isolated from the soil of Caatinga, a Brazilian Biome (UCP 1286) was selected for collagenase production. Fermentation system allowing obtention of collagenolytic activity about 2.7 times higher than existing data, with the highest values of collagenolytic and specific activity (379.80 U/mL, 1460.77 U/mg, respectively), after 126 hours. Applying a factorial design, enzyme production was increased by about 65% compared to the preliminary results. The factorial design demonstrated the existence of two factors with statistical significance on the production of the enzyme: pH and temperature, both with negative effects. Enzyme was found to be more active at pH 9.0 and 37 °C, and also to be very stable in comparison with the collagenase produced by other microorganisms. The enzyme seems to belong to collagenolytic serine proteases family. Concerning the substrate specificity, it was observed that the highest enzyme activity corresponds to azocoll, there was no relevant activity on azocasein and the enzyme showed to be more specific to type V collagen and gelatin than the commercial collagenase produced by *Clostridium histolyticum*. Major band observed at electrophoresis was approximately 37 kDa. Zymogram analysis confirmed the collagenolytic activity. All data indicates this enzyme as promising biotechnology product.

1. INTRODUCTION

Collagen is the major fibrous element of skin, bones, tendons, cartilage, blood vessels and teeth found in all animals [1,2]. Collagen is found in connective tissues, making up approximately 30% of the protein in human body [3,4]. Because of the rigid structure of collagen (three helically wound polypeptide fibrils) its degradation is restricted to a few proteases [2]. Collagenases are specific enzymes that can hydrolyze both

native and denatured collagens [5,6]. These enzymes can degrade native triple helix of collagen to small fragments and play an important role in connective tissue metabolism [7,8]. Collagenolytic enzymes are a kind of proteases that are related to various physiological and pathological processes and have several applications in industry, medicine and biotechnology [6,9–11]. With biotechnology accelerated growth, applications of proteases have expanded to new areas such as clinical, medicinal and analytical chemistry [12]. Among various sources of proteases, those produced by microorganisms play an important role in biotechnological processes and are used with increasing frequency, as large amounts of these enzymes can be produced quickly and at low cost [13]. Search for microbial collagenases has been increasing due to their wide application, as they are able to cleave collagen helix at multiple sites, while mammalian collagenases cleave at a single site [1,14].

* Corresponding Author

Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil. Email: analuporto@yahoo.com.br, Telephone number: +55 81 33206391, Fax number: +51 81 21268485

APÊNDICE C - PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A
COLLAGENASE FROM *PENICILLIUM* SP. UCP 1286 BY POLYETHYLENE
GLYCOL-PHOSPHATE AQUEOUS TWO-PHASE SYSTEM, PUBLICADO NA
REVISTA PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, DOI:
10.1016/J.PEP.2017.02.010

Protein Expression and Purification 133 (2017) 8–14



Contents lists available at ScienceDirect

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep



Purification and characterization of a collagenase from *Penicillium* sp.
UCP 1286 by polyethylene glycol-phosphate aqueous two-phase
system



Maria Carolina de Albuquerque Wanderley^a, José Manoel Wanderley Duarte Neto^a,
Wendell Wagner Campos Albuquerque^b, Daniela de Araújo Viana Marques^c,
Carolina de Albuquerque Lima^d, Sara Isabel da Cruz Silvério^e, José Luiz de Lima Filho^a,
José Antônio Couto Teixeira^e, Ana Lúcia Figueiredo Porto^{b,*}

^a Laboratory of Immunopathology Kelso Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco, Av. Prof. Moraes Lima do Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brazil

^b Department of Morphology and Animal Physiology, Federal Rural University of Pernambuco, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife, PE, Brazil

^c Serra Talhada Campus, University of Pernambuco (UPE), Av. Afonso Magalhães, s/n, Serra Talhada, PE, Brazil

^d Faculty of Science, Education and Technology of Garanhuns, University of Pernambuco-UPE, Av. Capitão Pedro Rodrigues, n° 105, Garanhuns, PE, Brazil

^e Centre of Biological Engineering, University of Minho, Campus Gualtar, 4710-057, Braga, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2017

Received in revised form

22 February 2017

Accepted 22 February 2017

Available online 24 February 2017

Keywords:

Collagenolytic enzyme

Collagen

ATPS

Purification

ABSTRACT

Collagenases are proteolytic enzymes capable of degrading both native and denatured collagen, reported to be applied in industrial, medical and biotechnological sectors. Liquid-liquid extraction using aqueous two-phase system (ATPS) is one of the most promising bioprocess separation techniques, which can substitute difficult solid-liquid separation processes, offering many advantages over conventional methods including low-processing time, low-cost material and low-energy consumption. The collagenase produced by *Penicillium* sp. UCP 1286 showed a stronger affinity for the bottom salt-rich phase, where the highest levels of collagenolytic activity were observed at the center point runs, using 15.0% (w/w) PEG 3350 g/mol and 12.5% (w/w) phosphate salt at pH 7.0 and concentration. The enzyme was characterized by thermal stability, pH tolerance and effect of inhibitors, showing optimal collagenolytic activity at 37 °C and pH 9.0 and proved to be a serine protease. ATPS showed high efficiency in the collagenase purification, confirmed by a single band in SDS/PAGE, and can in fact be applied as a quick and inexpensive alternative method.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Collagen is a protein composed of three peptide chains associated in a triple helical structure, found in connective tissues of animals and corresponding to about 30% of the entire protein content in the human body [1,2]. Collagenases are proteolytic enzymes capable of degrading both the native and denatured collagen [3–5] and they are related to physiological and pathological processes, with many applications in industry, medicine and biotechnology, as collagen hydrolysis, wound repair and production of bioactive peptides [5–9].

Among several methods described in the literature for separation and purification of proteases, ultrafiltration, precipitation and chromatography are the most common used [10]. However, for industrial scale, such procedures are not considered profitable due their high cost and long processing time [11]. Thus, the search for alternative protease purification methods has become increasingly common [12]. Liquid-liquid extraction using aqueous two-phase systems (ATPS) is one of the most promising bioprocess separation techniques which can, although being simple and inexpensive, be used in place of difficult solid-liquid separation processes, in the initial or subsequent purification steps [13].