

CLARICE AOKI OSAKU

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR DE  
*Thelephora terrestris***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, como requerimento parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

CURITIBA  
1996

CLARICE AOKI OSAKU

**ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR DE *Thelephora terrestris***

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná, pela comissão formada pelos professores:

Membros: Dr<sup>a</sup>. Glaci Therezinha Zancan

Departamento de Bioquímica, UFPR

Dr<sup>a</sup>. Madalena Baron

Departamento de Bioquímica, UFPR

Dr. Breno Leite

Departamento de Bioquímica, UFPR

Curitiba, 18 de dezembro de 1996

Orientação: Profª. Drª. Glaci Therezinha Zancan

Se num ser microscópico vermos a vida, poderemos entender a grandeza de Deus, que faz do menor ao maior ser uma única fonte de existência. Quando entendermos isso, entenderemos a existência. Quando entendermos a existência, a ciência dará o maior passo, não para transformá-la, mas para vivermos em harmonia com todas as formas de vida.

Atair

Aos meus pais Fukumi e Keiko,  
ao Nelson, Erica Fernanda,  
Flávia Cristina e Wilian André  
*com amor*

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Glaci Therezinha Zancan por ter propiciada a oportunidade de, com liberdade, buscar os caminhos para o meu crescimento. Mais do que orientação e ensinamento, sua atitude intransigente como educadora e pesquisadora, estará sempre presente como um norte em minha vida profissional e pessoal.

À coordenação do Curso de Pós-Graduação que durante todo esses anos ofereceu o apoio necessário.

Ao Departamento de Bioquímica e a todos o seu corpo docente pelos ensinamentos e incentivo na busca científica.

Ao Prof. Dr. Hidevaldo Machado pelo apoio e amizade.

À amiga Iara Machado sobretudo pelo carinho em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e aos integrantes do Laboratório de Fixação de Nitrogênio e Biologia Molecular por terem cedidos gentilmente os equipamentos necessários às minhas pesquisas.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Leda Shubatsu pelas sugestões.

À Carla Kanufre e Mareci Mendes pelo companheirismo e amizade desfrutados no dia a dia do laboratório.

À Amélia, Elizabeth, Ruthe e Helena pela atenção e carinho de sempre.

Aos colegas de turma, Silvia Malucelli, Selene Lobo, Paulo Favero, Sandro Germano, Tania Bonfim, Tania Bresolin, e Fabiana Postiglione, pelo carinho.

Aos colegas do Departamento de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UNIOESTE pela colaboração que possibilitou o meu afastamento da Instituição.

A todos os servidores técnicos-administrativos do Departamento de Bioquímica da UFPR pelo profissionalismo e amizade.

Às bibliotecárias Telma e Isabele pela colaboração na elaboração dos trabalhos científicos.

A UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade de aperfeiçoamento profissional.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e FINEP/BID (conv. 6492012100) pelo uso dos equipamentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xvi</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ECTOMICORRIZA.....	01
1.2 PROTEASES.....	05
1.2.1 Serinas e cisteína proteases.....	07
1.2.2 Proteinases aspárticas.....	12
1.2.3 Metaloproteinases.....	15
1.3 REGULAÇÃO DAS PROTEASES.....	16
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 MICRORGANISMO.....	22
3.2 MATERIAIS.....	22
3.3 MEIOS DE CULTURA.....	22
3.4 CURVA DE PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO.....	23
3.6 CULTIVO COM E SEM AGITAÇÃO.....	25

3.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E FOSFATO DE AMÔNIO.....	26
3.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO E SULFATO DE COBRE.....	26
3.9 ENSAIO PARA GLUCOSE RESIDUAL.....	27
3.10 ENSAIO PARA AMÔNIA RESIDUAL.....	27
3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	27
3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASE EXTRACELULAR...	28
3.13 INDUÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	29
3.14 ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS..	30
3.15 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO .....	30
3.16 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DAS PROTEASES EXTRACELULARES.....	31
3.17 TEMPERATURA ÓTIMA E ESTABILIDADE TÉRMICA.....	32
3.18 INIBIDORES DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	32
3.19 ENSAIO PARA REVERSÃO DE INIBIÇÃO.....	33
3.20 ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CISTEÍNA/ HCl.	33
3.21 ENSAIO COM CÁTIONS PARA A ATIVAÇÃO DA ENZIMA PROTEÁSICA.....	33
3.22 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS E NATIVO.....	34
3.23 CROMATOGRAFIA EM CM-CELULOSE.....	35

<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Thelephora terrestris</i> .....	37
4.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	37
4.3 EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DA PROTEASE.....	40
4.4 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE SOBRE OS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR.....	42
4.5 EFEITO DAS CONCENTRAÇÕES DE FOSFATO DE AMÔNIO SOBRE OS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR.....	47
4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO E SULFATO DE COBRE NOS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR.....	53
4.7 INDUÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR COM GELATINA.....	56
4.8 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE MEIO DE CULTIVO.....	58
4.9 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA PROTEASE EXTRACELULAR.....	58
4.10 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E A ESTABILIDADE DA PROTEASE.....	63
4.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO PARA DETERMINAÇÃO DO Km.....	63

4.12 AGENTES INIBIDORES QUE AFETAM A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	67
4.13 EFEITO DOS PROTETORES DO GRUPO SH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	67
4.14 EFEITO DOS CÁTIONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	72
4.15 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM ELETROFORESE.....	72
4.16 PERFIL PROTÉICO DO FILTRATO EM CM-CELULOSE EM GEL DE POLIACRILAMIDA. (SDS-PAGE).....	77
<b>5 DISCUSSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>85</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA <i>Thelephora terrestris</i> COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES.....	39
TABELA 2	EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DA ENZIMA PROTEOLÍTICA PELA <i>Thelephora terrestris</i> .....	41
TABELA 3	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO DE AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE <i>Thelephora terrestris</i> .....	52
TABELA 4	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SULFATO DE MAGNÉSIO NOS NÍVEIS DA PROTEASE EXTRACELULAR..	54
TABELA 5	EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE COBRE NOS NÍVEIS DA PROTEASE EXTRACELULAR.....	55
TABELA 6	INDUÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES EXTRACELULARES EM <i>Thelephora terrestris</i> .....	57
TABELA 7	EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEASE EXTRACELULAR EM <i>Thelephora terrestris</i> .....	68
TABELA 8	EFEITO DE INIBIDORES DE GRUPOS SH SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA EM <i>Thelephora terrestris</i> .....	69

TABELA 9 REVERSÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR PROTETORES DE GRUPO SH.....	70
TABELA 10 EFEITO DA CISTEÍNA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	71
TABELA 11 REVERSÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR CÁTIONS.....	74
TABELA 12 ATIVAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR EM <i>Thelephora</i> <i>terrestris</i> COM DIFERENTES ÍONS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CURVA DE PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO DE <i>Thelephora</i> <i>terrestris</i> .....	23
FIGURA 2	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Thelephora terrestris</i> .....	38
FIGURA 3	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Thelephora terrestris</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE.....	43
FIGURA 4	NÍVEIS DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE.....	44
FIGURA 5	SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE.....	45
FIGURA 6	DOSAGEM DE GLUCOSE RESIDUAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE.....	46
FIGURA 7	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>Thelephora terrestris</i> EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO	48
FIGURA 8	NÍVEIS DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO.....	49
FIGURA 9	PROTEÍNA DO MEIO DE CULTIVO EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO.....	50

FIGURA 10 DOSAGEM DE AMÔNIA RESIDUAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO.....	51
FIGURA 11 ATIVIDADE PROTEÁSICA EM FUNÇÃO DOS VOLUMES DE MEIO DE CULTIVO.....	59
FIGURA 12 EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	60
FIGURA 13 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	61
FIGURA 14 ESTABILIDADE AO pH.....	62
FIGURA 15 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	64
FIGURA 16 ESTABILIDADE TÉRMICA.....	65
FIGURA 17 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AZOCASEÍNA.....	66
FIGURA 18 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM ELETROFORESE.....	76
FIGURA 19 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPSF	-	fluoreto p-amidinofenil-metil-sulfonila
BSA	-	soro albumina bovina
DIFP	-	diisopropilfluorfosfato
DTNB	-	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
DTT	-	ditiotreitol
E-64	-	butano-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)
EDTA	-	ácido etileno-diamino-tetracético
EGTA	-	ácido etilenoglicol bis (β-aminoetil éter) N',N'-tetra acético
MNN	-	Modifield Melin-Norkran
pCMB	-	p-cloromercúrio-benzoato
p-CMPSA	-	ácido p-cloromercúrio-fenil-sulfônico
PMSF	-	fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	-	sódio dodecil sulfonato
SDS-PAGE	-	sódio dodecil sulfonato eletroforese em gel de poliacrilamida
TPCK	-	N-tosil-L-fenilalanina-clorometil cetona

## RESUMO

O fungo ectomicorrízico *Thelephora terrestris* libera no meio de cultivo uma atividade proteolítica que foi caracterizada. A atividade proteolítica extracelular foi demonstrada usando azocaseína como substrato com  $Km_{(app)}$  de  $2,0 \pm 0,5$  mg/mL. A atividade extracelular de azocaseinase demostrou ser ótima a pH 4,8 e estável por 24 horas a 4° C, na faixa de pH 4,0 a 5,6. A temperatura ótima da atividade enzimática foi de 40° C, sendo que a 50° C perde em torno de 50% da sua atividade em 10 minutos de incubação. A atividade proteolítica foi inibida por 5 mM de pCMB (70,28%), por EDTA 10 mM (72%), por pepstatina 1 $\mu$ M (45%), por E-64 0,25 mM (22%) e por PMSF 4mM (21%). Os níveis de atividade proteoítica extracelular reportado por massa micelial não variaram com o aumento da concentração de glucose no meio, mas foram reprimidos por concentrações de fosfato de amônio superiores a 3,7 mM. Quando a gelatina foi utilizada como fonte de carbono e nitrogênio houve a duplicação nos níveis de enzima. As adição de glucose ao meio contendo gelatina resultou na repressão da atividade enzimática. As secreção de enzima somente foi detectada em cultivos com agitação. A análise eletroforética demonstrou a presença de 3 bandas protéicas com atividades enzimáticas.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DO ECTOMICORRIZA

Os fungos e as raízes de plantas convivem mutualisticamente formando o que se chama de micorriza. Dois principais grupos de micorrizas são conhecidos: as ectomicorrizas e endomicorrizas. Nas endomicorrizas o fungo vive associado intracelularmente com a raiz, enquanto que nas ectomicorrizas seu desenvolvimento ocorre entre as células do córtex da raiz (Meyer, F.H., 1974).

O fungo basidiomiceto *Thelephora terrestris* interage simbioticamente com a raiz de *Pinus* resultando em ectomicorriza. Esta associação pode ser concebida como a formação de uma integração fisiológica complexa, representando distintamente uma nova entidade em si, pois o hospedeiro e o simbionte são marcadamente alterados (Martin e Hilbert, 1991).

As ectomicorrizas são formadas por fungos pertencentes a classe dos Basidiomicetos, Ascomicetos e Ficomicetos. As plantas hospedeiras destes fungos são predominantemente as árvores que pertencem as famílias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Salicaceae, Myrataceae, Juglandaceae, Ericaceae e outras (Marx e Kenney, 1982).

Do ponto de vista ecológico são importantes por associarem-se com diversas espécies florestais e por colonizarem efetivamente áreas depauperadas. Incluem desta maneira, a proteção da planta contra patógenos do solo, o aumento de

tolerância à aridez, à alta temperatura, às extremas variações do pH, às toxinas orgânicas e inorgânicas e às altas concentrações de enxofre, alumínio, magnésio e zinco (Tosh et al., 1993).

Os fungos micorrizas estão envolvidos em diferentes estágios do metabolismo do nitrogênio: a quebra do nitrogênio orgânico do solo, a obtenção e translocação para o hospedeiro de nitrogênio orgânico solúvel (aminoácidos) ou formas minerais ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) e na assimilação destes. O primeiro estágio no nitrogênio orgânico ocorre por ação de proteases com liberação de aminoácidos solúveis os quais são absorvidos com relativa facilidade pelas plantas (Plassard, C. et al., 1985).

O fungo ectomicorrízico *Thelephora terrestris* requer associação com plantas hospedeiras para o ciclo de vida completo. Não se tem obtido sucesso para, em meio de composição definida, germinar esporos de *Thelephora terrestris*; embora na presença de raízes de *Pinus sylvestris*, ocorra a germinação *in vitro* (Hacskaylo, E. 1983).

O isolamento e a manipulação experimental dos cultivos dos fungos ectomicorrízicos têm sido críticos no desenvolvimento da pesquisa sobre aspectos fisiológicos. *In vitro*, o crescimento é afetado com as variações do pH, temperatura, nutrientes do meio, sais minerais e hormônios (Molina e Palmer, 1982).

O fungo ectomicorrízico *Laccaria laccata* quando cultivado em grau variado de oxigenação não apresenta diferenças significativas, indicando que este fungo não seja exigente em relação ao oxigênio (Kuek, C., 1996).

Melhuish e Hacshaylo (1980) determinaram que a concentração ótima para obtenção da massa micelial para *Pisolithus tinctorius* em cultivos sob condições

específicas, independia da relação carboidrato/nitrogênio.

Smith (1982) estudando as condições fisiológicas para o crescimento *Pisolithus tinctorius* inoculou-o em meio MMN (Modifield Melin-Norkran). Com agitação, observou que o fungo crescia igualmente em diferentes relações de glucose - sulfato de amônia e, utilizando diferentes fontes de carbono, concluiu que, os monossacarídeos, na maioria das vezes, são mais eficientemente metabolizados do que os dissacarídeos. A glucose e o manitol foram melhor metabolizados e determinaram uma grande multiplicação celular - a sacarose rendeu mais micélio do que a maltose e lactose, nas avaliações com concentrações equivalentes de carbono.

Pradella et al. (1990), partindo do meio de cultura MMN completo estudaram as influências de várias fontes de nitrogênio:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , peptona e glutamato de sódio, na velocidade de crescimento micelial do fungo ectomicorriza *Pisolithus tinctorius*. Estes autores observaram que a adição de extrato de levedura, glutamato de sódio e peptona ao meio de cultura MMN, provocavam um aumento na velocidade de crescimento celular do fungo.

Molina e Palmer (1982), discutindo as condições de cultivo dos fungos ectomicorrízicos destacam que os macronutrientes como o fósforo, potássio, enxofre e magnésio devem ser adicionados aos meios mínimos e de composição definida; bem como o cobre, ferro, cálcio, manganês, molibdênio e zinco, em pequenas quantidades, já que o crescimento de quase todos os fungos estudados os exigem.

Thompson e Medve (1984) investigaram a tolerância de quatro fungos ectomicorizas - *Cenococcum graniforme*, *Pisolithus tinctorius*, *Suillus luteus* e *Thelephora terrestris*, às concentrações de sulfato de alumínio e sulfato de

manganês, variando de 0 a 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , no meio MMN a pH 3,4. O fungo *Thelephora terrestris* foi intolerante ao alumínio a 450 ppm e os demais mostraram algum crescimento em diferentes concentrações de alumínio. A 500 ppm todos os quatro fungos mostraram menos de 65% de crescimento comparado ao controle. O sulfato de manganês foi o menos fungitóxico.

Marx et al. (1970) estudando os fungos ectomicorrízicos *Pisolithus tinctorius* e *Thelephora terrestris*, observaram a influência significativa da temperatura no grau de desenvolvimento desses fungos. Comparando as massas miceliais dos fungos isolados do meio MMN líquido, observaram que os isolados 29 e 49 do *Pisolithus tinctorius* tiveram desenvolvimento melhor a 29° C. Os isolados 1 e 3838 de *Thelephora terrestris* cresceram igualmente em meio líquido e sólido nas temperaturas entre 14° C a 26° C, com uma temperatura superior limite de 34° C.

Cline et al. (1987) estudando a temperatura ótima para o crescimento em cultura pura de diferentes isolados de fungo, observaram que o *Pisolithus tinctorius* apresentava alto crescimento em diferentes temperaturas, com um crescimento ótimo para todos os isolados ocorrendo entre 21° C e 32° C. Dependendo do isolado examinado, a temperatura máxima para o crescimento de *Cenococcum geophilum*, variou entre 16° C e 27° C. e para o *Suillus granulatus* oscilou entre 21° C a 32° C. Diferentes linhagens de *Thelephora terrestris*, tiveram comportamentos distintos. O isolado Tt 227 exibiu um baixo crescimento a temperatura de 27° C, o Tt 201 alto crescimento e o Tt 142 crescimento intermediário.

O fato dos fungos ectomicorrízicos até agora estudados apresentarem respostas distintas face a diferentes variáveis, faz com que seja importante um

aprofundamento nas pesquisas da fisiologia desses fungos.

## 1.2 PROTEASES

Por um longo período, a proteólise foi vista apenas como um mecanismo no controle do metabolismo celular, pelo fato que era difícil de se imaginar que os constituintes macromoleculares celulares vitais, os quais são sintetizados às custas de muita energia, fossem destruídos juntos com as células. Atualmente sabe-se que as proteases são essenciais a regulação intracelular. Essas enzimas têm sido associadas a vários processos, entre os quais (Wolf, 1982):

- a) degradação de peptídeos exógenos visando a obtenção de aminoácidos para nutrição;
- b) inativação específica ou modificação de proteínas biologicamente ativas;
- c) renovação contínua para regulação dos níveis de proteínas;
- d) eliminação seletiva de proteínas danificadas ou anormais;
- e) degradação de proteínas celulares indesejáveis para suprir aminoácidos e energia durante a desnutrição e a diferenciação;
- f) maturação de proteínas:
  - remoção de N-formilmetionina ou metionina da proteína recentemente sintetizada;
  - remoção de uma extensão peptídica da proteína;
  - clivagem dos produtos de tradução do mRNA monocistrônico para vários polipeptídeos distintos;

- conversão de proteínas inativas (zimogênios) a seus produtos biologicamente ativos.

O termo protease é usado amplamente para todas as enzimas que clivam ligações peptídicas (EC 3.4). As proteases podem ser subdivididas em exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-24). As exopeptidases atuam sobre ligações peptídicas amino ou carboxi terminal, ao passo que as endopeptidases clivam ligações peptídicas internas nos peptídeos. Proteinases, é um termo usado somente para as endopeptidases e são classificadas de acordo com a presença do resíduo catalítico essencial em seu sítio ativo (Khan e Roufogalis, 1994).

Quatro distintas classes de proteinases são conhecidas: a) serinas proteinases (EC 3.4.21) - caracterizadas pela presença de resíduo de serina no seu centro ativo, o qual é o sítio de ligação do substrato; b) cisteínas proteinases (EC 3.4.22) - com um resíduo essencial de cisteína responsável pela ligação ao substrato; c) proteinases aspárticas (EC 3.4.23) - contendo um ou dois resíduos de aspárticos no seu centro ativo participando na catálise; d) metaloproteinases (EC 3.4.24) - contendo íons metais, usualmente o zinco, em seu sítio ativo (North, 1982; Khan e Roufogalis, 1994).

Nos fungos, a maioria das proteases são extracelulares. Em algumas espécies somente um tipo foi detectado, em muitas outras espécies duas proteases ou até três foram encontradas, com a prevalência de aspártico e serinas proteinases, expressas em condições diferentes de crescimento para cada tipo (North, 1982).

### 1.2.1. Serinas e cisteínas proteinases

As serinas proteases são inibidas por fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) e diisopropilfluorofosfato (DIFP). Muitas delas também são inibidas por reagentes como p-cloromercuriobenzoato, podendo refletir a proximidade de um resíduo de cisteína ao sítio ativo. Ligações de resíduos volumosos a esta cisteína podem indiretamente afetar a ligação com o substrato, como foi sugerido para a serina carboxipeptidase Y de levedura (Bai e Hayashi, 1979). Isto no entanto, não significa que a cisteína participe do mecanismo catalítico. De fato, observou-se com o uso de inibidores, que muitas serinas proteinases de fungo não possuem resíduos de cisteínas no centro ativo (Mikes et al, 1969).

Relatos de ocorrência de cisteínas proteases em fungos são muito escassos. Desde que o p-cloromercuriobenzoato inibe também as serinas proteases, demonstrar que a enzima seja uma cisteína protease, tornou-se somente possível com o uso de inibidores mais sensíveis, tais como o iodoacetamida e por aqueles cuja atividade da enzima pode ser aumentada, como os agentes redutores: ditiotreitol (DTT) e cisteína (North, 1982).

Groninger e Eklund, (1966), estudando a enzima proteolítica do fungo *Trichosporon* sp, observaram a atividade contra os substratos caseína e hemoglobina, e a falta de ação contra soro albumina bovina e lisozima. O pH ótimo da enzima oscilou entre 5,8 a 6,2. A inibição ocorreu totalmente com 1 mM de pCMB e foi levemente ativada por 10 mM de cisteína, 0,1 mM EDTA e 0,1 mM de  $\text{Co}^{++}$ . Com concentrações de 10 mM de  $\text{Co}^{++}$  e 0,1 mM de PMSF, foi levemente inibida. O aquecimento a 60° C por 10 minutos inativou completamente a proteinase.

A atividade de elastase do fungo dermatófito *Nannizzia fulva*, ativa a pH 8,0 foi inibida por p-cloromercuriobenzoato e iodoacetamida, mas não teve a sua atividade aumentada por cisteína e EDTA (Ripon, 1968).

Kundu e Manna (1975) purificaram e caracterizaram proteinases extracelulares de *Aspergillus oryzae*. A massa molecular estimada por gel filtração para a proteinase I é cerca de 70 kDa e para a proteinase II de 35 kDa. O pH ótimo para a hidrólise dos substratos caseína e hemoglobina foi de 6,5 a 60° C para a proteinase I e de 10,0 a 45° C para a proteinase II. A hidrólise da gelatina foi de 6,5 para as duas enzimas. As enzimas foram estáveis numa faixa entre pH 6,0 e 8,0 a 30° C por 60 minutos. A atividade enzimática de ambas proteinases foram ativadas por Cu<sup>2+</sup> e inibidas por Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup> e Ag<sup>+</sup>. A proteinase I foi inibida por pCMB e iodoacetato. A proteinase II foi inibida por N-clorosuccinamida e DFP (diisopropil fluorofosfato). Agentes redutores ativaram a ação de ambas as enzimas.

Fischer e Tomson (1979) purificaram e caracterizaram três serinas proteinases de *Phycomyces blakesleeanus*. As massas moleculares, determinados por eletroforese, foram respectivamente para B-CM, B-DI e B-DII: 18 kDa, 22 kDa e 60 kDa. O pH ótimo para cada isolado foi de 7,6, 7,5 e 7,0 respectivamente. Os pontos isoelétricos ficaram em 7,6, 5,1 e 4,4. A proteinase A constituída de duas frações (B-CM e B-DII) foi inibida em 98% por PMSF 1mM, 94% de p-CMB 5 mM e 97% de EDTA 50 mM. A proteinase B (B-DI) foi inibida em 96% por pepstatina 1 mM.

Botton et al (1986) cultivaram o fungo *Cenococcum geophilum* em meio completo tendo como fonte de nitrogênio a amônia. Após 8 dias de cultivo, com os níveis de atividade catalítica baixos, os micélios foram filtrados e transferidos para um meio de cultura fresco contendo proteínas (gelatina, BSA e caseína) como fonte

de nitrogênio. As atividades enzimáticas, sob condições de indução, apareceram em 24 a 30 horas. A secreção de proteases continuou linearmente por até 10 dias. A gelatina foi melhor indutor do que o BSA e caseína. As proteases secretadas foram totalmente inibidas por diisopropilfluorofosfato 5 mM, o que as incluem no grupo de serinas proteases. O máximo de atividade das proteases extracelulares foi em pH 8,2 e pH 11,0 para cada enzima.

Bidochka e Khachatourians (1987) purificaram uma serina proteinase com massa molecular estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS de 35 kDa. Esta protease secretada pela *B. bassiana* foi inibida em 95% por PMSF, sendo inibida por  $HgCl_2$ , mas não por iodoacetamida, levando os autores a sugerirem que o grupo sulfidrílico não se encontra localizado no sítio ativo da enzima. A temperatura ótima para a atividade de proteólise do fungo *Beauveria bassiana* ficou entre 37° C e 42° C. Esta mesma protease foi estável por 40 minutos a 27° C, mas foi inativada a temperaturas mais altas. Havia aproximadamente ainda 40% de atividade após 30 minutos a 40° C ou depois de 5 minutos a 50° C. A temperatura de 60° C a protease foi rapidamente inativada em 5 minutos.

Bidochka e Khachatourians (1988) determinaram o pH ótimo de 8,5 para atividade proteásica de *Beauveria bassiana* tendo como substrato azocoll e observaram que a atividade diminuía para os valores de pH abaixo de 7,0 e acima de 9,0. A protease manteve-se estável ao pH entre os valores de 5,5 a 12,0.

Hasnain et al. (1991) purificaram e caracterizaram uma proteinase do fungo filamentoso *Thermomyces lanuginosus*. A protease com massa molecular de 32 kDa foi efetivamente inibida por  $Hg^{2+}$  e por PMSF, resultando numa perda completa da atividade em menos de 3 horas. Inibições significativas verificaram-se após 24

horas de incubação com pCMB, pCMPSA, AMPSF e TPCK na concentração de 0,1 mM. Toda a atividade proteolítica da amostra da enzima “humicolin”, quando aplicada na Con-A Sepharose, ligou-se a coluna, indicando que a enzima é glicosilada.

A massa molecular aparente da enzima nativa carboxipeptidase 3 (CP3) de *Mucor racemosus* foi estimada por gel filtração em 52 kDa (DiSanto et al., 1992). Utilizando um inibidor marcado [ $H^3$ ] DFP, os autores observaram que o resíduo do sítio catalítico está sobre uma pequena subunidade de carboxipeptidase. A CP3 foi classificada como serina protease, desde que sua atividade catalítica foi bloqueada por inibidores de serina proteases como PMSF 100  $\mu M$  (72%), DFP 0,6  $\mu M$  (96%) e 3-4 dicloro Socoumarin (DCI) 10  $\mu M$  (96%). A enzima foi fortemente inibida por compostos mercuriais como p-CMB 0,1  $\mu M$  (96%). A temperatura ótima de atividade enzimática foi de 45° C e o pH ótimo de 6,5.

A purificação e caracterização de uma protease, em cultivos com substrato sólido, de *Phanerochaete chrysosporium* foi descrita por Datta (1992). A proteína purificada tem uma massa molecular em torno de 40 kDa em eletroforese com SDS. O seu ponto isoelétrico é de 5,6 e o pH ótimo de 4,0. A enzima proteolítica foi totalmente inibida por  $Hg^{2+}$ , ácido p-hidroximercuriobenzoato e N-bromosuccinamida, mas foi insensível ao PMSF, pepstatina A e EDTA. A ligação da protease com concanavalina A indica que ela é uma glicoproteína. Os dados sugerem propriedades de proteases tipo aspárticas e tióis proteases.

Cole et al. (1993) purificaram e caracterizaram parcialmente 2 proteases de *Metarhizium anisopliae*. Uma das proteases, com ponto isoelétrico de 5,4 e massa molecular de 28,8 kDa, foi inibida em 100% por PMSF, sendo classificada como

uma “clássica” tripsina acompanhando a classe das serinas proteases. A outra protease com ponto isoelétrico de 4,6 e massa molecular de 26,7 kDa foi inibida por ácido iodoacético (46%), pCMB (78%), e DTNB (98%) e foi ativada por ditiotreitol e 2-mercaptopropano. Como esta enzima foi inibida por reagentes tióis e sua atividade aumentou pela presença de agentes redutores foi classificada como cisteína protease.

Agentes redutores DTT e cisteína inibiram a atividade proteolítica de *Rhizophydiump* sp. O reagente sulfidrílico pCMB também causou um decréscimo nos níveis de atividade proteolítica. Para Krarup et al. (1994) isto significava que as pontes de dissulfeto apresentavam efeito estabilizante sobre a enzima e a inibição por pCMB seria devida à quebra das pontes acompanhada pela reação entre pCMB e os resíduos de cisteína.

Carmona et al. (1995) caracterizaram a proteinase extracelular do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. A atividade de peptidase extracelular do fungo foi máxima em pH 9,0 e foi irreversivelmente inibida por PMSF, acetato de mercúrio e p-hidroximercuriobenzoato. A inibição por compostos mercuriais foi parcialmente revertido por cisteína/EDTA. O butano-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino) (E-64) foi um fraco e reversível inibidor, entretanto o EDTA e a pepstatina não tiveram ação sobre esta proteinase. Considerando que a proteinase do fungo *P. brasiliensis* era homogênea os autores sugeriram que a enzima seria da sub-família das serinas contendo grupos SH.

### 1.2.2 Proteinases aspárticas

Vários fungos produzem proteinases que são ativas em pH ácidos, e um grande número mostrou consistente com as propriedades das proteases aspárticas. Usando-se inibidores marcados para isolar o sítio ativo, demonstrou-se diretamente o envolvimento de um ou dois resíduos de ácidos aspárticos (Kovaleva et al, 1972).

As proteinases ácidas não são todas inibidas pelo inibidor específico pepstatina ou pelo S-PI (*streptomyces pepsin inhibitor*). Ito e Yamasaki (1976) relatam a existência de um pequeno grupo de enzimas insensíveis como proteinase A de *Aspergillus niger*. Proteinases extracelulares de outros basidiomicetos também têm sido relatadas como insensíveis ao S-PI (Oda et al, 1981). Em geral, o inibidor de pepsina, brometo p-bromofenacil, não inibe proteinases ácidas de fungo. Tsushima et al. (1994) utilizaram 2  $\mu$ M de pepstatina e obtiveram uma inibição de 100% em proteinase aspártica de *Candida albicans*.

Tsujita e Endo (1980) isolaram várias formas moleculares de proteases ácidas de *Aspergillus oryzae* que possuem as mesmas propriedades catalíticas tais como pH ótimo, ativação por tripsinogênio pancreático bovino e inativação por baixas concentrações sódio dodecil sulfonato. As massas moleculares das várias formas de protease ácida variaram entre 32 kDa a 150 kDa, em função do conteúdo de carboidratos.

Dois tipos de proteinases ácidas extracelulares foram identificadas quando *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivado em meio líquido com condições limitantes de nitrogênio e com variação na concentração de glucose. A atividade que foi liberada no meio durante a fase exponencial de crescimento não sofreu

alteração com a concentração de glucose. Já a atividade liberada mais tarde pareceu estar associada com a limitação da fonte de carbono. A suplementação diária de glucose reprimiu completamente a mesma atividade proteolítica (Dosoretz et al., 1990).

O fungo ectomicorrízico *Hebeloma crustuliniforme* (Zhu et al, 1994) foi cultivado em meio MMN líquido de composição definida contendo diferentes combinações de amônia, glucose e soro albumina bovina (BSA) como fonte de carbono e de nitrogênio. A produção de proteinase extracelular foi máxima em meio contendo BSA como fonte de nitrogênio. Os níveis de enzima não foram afetados pela variação da concentração da glucose, mas foram reprimidas por altas concentrações de amônia. O pH ótimo para a produção de proteinase ficou na faixa de 4,0 e 5,0. No pH 3,0 o fungo produziu 10% a menos de massa micelial do que no pH 5,0, embora a produção de proteinase por mg de peso seco não tenha sido afetada. A produção de protease é dependente do pH, sendo máxima a pH 3,0, correspondente ao pH ótimo da enzima e dentro da faixa de pH em que ela é estável.

Singh (1994) estudando a produção de proteases ácidas do gênero *Aspergillus* descreveu uma atividade proteolítica de *Aspergillus niger* 2078 com pH ótimo de 4,0. Esta protease ácida tem sua atividade máxima a 60° C, conservando 60% da atividade a 80° C. A protease ácida de *Penicillium expansum* foi estável somente a 45° C, entretanto as enzimas de *Aspergillus oryzae* e as de *Aspergillus cladodes* perderam suas atividades em temperaturas superiores a 40° C. Foi determinado o pH ótimo para a atividade proteásica ácida dos seguintes fungos: *Aspergillus saitoi*: 3,0 a 4,5, *Aspergillus oryzae*: 3,0 a 4,0, *Paecilomyces varioiti*: 3,5 a

5,5, *Mucor pusillus* :3,5 a 4,5 e *Rhizopus oligosporus*: 3,3 (Farley, 1992).

Wadekar et al. (1995) observaram que as atividades proteolíticas dos fungos *Serpula lacryman* e *Coriolus versicolor* apresentavam o pH ótimo de 5,6. Usando azocaseína como substrato foram identificadas no fungo *Serpula lacrymans* três enzimas proteolíticas intracelulares, com  $S_1$  de 65 kDa,  $S_2$  de 47 kDa,  $S_3$  de 43 kDa e uma extracelular  $S_4$  de 30 kDa. O extrato micelial do fungo *Coriolus versicolor* apresentou apenas uma banda maior de atividade proteolítica com massa molecular aparente entre 62 a 64 kDa . Já a enzima extracelular do mesmo fungo apresentou um padrão complexo com 5 bandas cujas massas variavam de 50 kDa a 100 kDa. As enzimas extracelulares pelas suas características foram incluídas em proteinases ácidas.

A protease ácida do fungo *Phycomyces blakesleeanus* foi purificada e caracterizada por De Vicente et al (1996). A massa molecular da enzima nativa foi estimada por gel filtração como sendo de 40 kDa. A natureza de glicoproteína para a protease ácida foi confirmada pela sua ligação a coluna de concanavalina A Sepharose 4B. O ponto isoelétrico da protease foi estimado em 4,2 e pH ótimo de 2,5 e temperatura ótima de 70° C, usando a hemoglobina como substrato. A atividade enzimática foi fortemente inibida por pesptatina A, um inibidor universal de proteinases aspárticas. Os dados da análise realizada indicam existência de inibição competitiva. O valor de  $K_m$  calculado foi de  $8,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$ .

### 1.2.3 Metaloproteinases

Metaloproteinases são enzimas ativas em pH em torno da neutralidade e possuem íons metais, usualmente o zinco, em seu sítio ativo, sendo responsáveis pela polarização da ligação peptídica a ser clivada (North, 1982; Khan e Roufogalis, 1994).

Proteinases I neutra de *Aspergillus oryzae* possui massa molecular entre 41 kDa e um pH ótimo em torno de 7,0 e a faixa de estabilidade pH entre 5,5 a 12. A enzima foi inibida em 100% por EDTA 0,01M mas não foi inibida por DFP (diisopropilfosforofluoreto) 0,01M ( Nakadai et al., 1973).

A proteinase II de *Aspergillus oryzae* tem uma massa molecular de cerca de 19.300 dalton estimado pelo método de gel filtração. A enzima tem um pH ótimo de 5,5 a 6,0 em tampão acetato e fosfato de sódio. Após incubação por 10 minutos a 90° C havia ainda 70% de atividade enzimática. Cerca de 70% da atividade enzimática foi inibida por EDTA 0,01 M a pH 6,0 (Nakadai et al., 1973).

Os pontos isoelétricos das proteinases I e II de *Aspergillus sojae* são respectivamente 4,7 e 4,2, com massas moleculares de 42,2 e 16,8 kDa (Sekine, 1973).

Gripon et al. (1980) sugerem que enzimas de *Penicillium caseicolum*, *Penicillium roqueforti* e a proteinase II neutra de *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus sojae* recebem o nome de metaloproteinases ácidas, por representarem uma classe distinta, com um pH ótimo baixo (5,0 a 6,0), massas moleculares de 19 a 20 kDa e por terem uma especificidade diferente em relação a oxidação da cadeia B da insulina, comparada a termolisina metaloproteinase neutra.

Markaryan et al. (1994), na caracterização da metaloproteinase do fungo *Aspergillus fumigatus* observaram a influência da temperatura entre 30° C a 85° C. A atividade ótima com o substrato azocaseína foi obtida a 60° C. A termoestabilidade da metaloproteinase foi medida a 60° C. A enzima perdeu cerca de 50% de atividade durante a incubação a 60° C por 1 hora.

A enzima proteolítica do fungo *Rhizophydium sphaerotheca* foi severamente inibida na presença de EGTA no substrato. A adição de um excesso de Ca<sup>2+</sup> restaurou quase toda a atividade enzimática, sugerindo que pelo menos uma das proteases do complexo proteolítico de *R. sphaerotheca* é uma metaloprotease estabilizada pelo Ca<sup>2+</sup> (Krarup et al, 1994).

A literatura mostra que a caracterização da atividade proteolítica pelo uso de inibidores só é pertinente quando as proteínas são homogêneas e neste caso ainda tem sido verificado que a atividade catalítica pode depender de mais de um grupo reativo.

### 1.3 REGULAÇÃO DAS PROTEASES

A atividade de protease, quando *Aspergillus oryzae* NRRL2160 foi cultivado em meio líquido contendo 1% de glucose, apareceu após vários dias de crescimento e quando o organismo havia atingido a fase estacionária de crescimento. Observou-se que a idade celular não foi o fator para a produção da enzima. Assim, quando as células jovens foram transferidas para um meio de cultivo que já havia servido como substrato para crescimento do fungo por 6 dias, a enzima foi imediatamente detectada no meio de cultivo, sugerindo que a composição do meio, o qual

presumivelmente foi alterado em função do crescimento, seja o maior fator na regulação do aparecimento extracelular da enzima. Os níveis de protease aumentaram somente depois que a concentração de glucose havia sido depletada. Isto demonstra que a concentração da fonte de carbono foi um fator importante na regulação do aparecimento da enzima no meio de cultivo (Klapper et al., 1973).

Embora certos compostos, particularmente amônia, glutamato e glutamina sejam fontes favoráveis de nitrogênio, os fungos são capazes de utilizar diversas fontes secundárias, incluindo nitrato, nitrito, purinas e proteínas. O uso destas fontes de nitrogênio secundárias invariavelmente requerem a síntese de enzimas catabólicas ou em alguns casos a ativação de enzimas previamente existentes. A síntese "de novo" de muitas enzimas requerem que duas condições sejam satisfeitas (Marzluf, 1981):

- a) suspensão da repressão catabólica do carbono e nitrogênio;
- b) indução específica das enzimas por substratos ou por intermediários da via catabólica envolvida.

Para Marzluf (1981) isto significa que existem sinais genéticos e metabólicos que são responsáveis pelos passos separados de repressão e indução da regulação do metabolismo do carbono e nitrogênio.

A regulação da expressão de protease em *Neurospora crassa* foi extensivamente estudada. Os estudos revelaram a presença de um sistema complexo, com um circuito regulatório múltiplo envolvendo gens regulatórios do metabolismo de carbono, nitrogênio e enxofre (Hanson e Marzluf, 1975).

Os níveis de proteinases dos fungos respondem às mudanças em nutrientes do meio, e têm sido notadas a indução e "desrepressão" de proteinases

extracelulares. A produção de enzimas extracelulares ocorre sob condições de limitações de nitrogênio, carbono e enxofre (North, 1982).

Segundo Bidochka e Khachatourians (1988), a síntese de protease pode estar reprimida se a glucose, amônia e o enxofre estiverem presentes, e serão sintetizadas e liberadas quando o meio de cultivo estiver deficiente em alguns destes componentes. Em *Lagenidium giganteum* (Dean e Domns, 1983) e *Aspergillus oryzae* (Klapper et al., 1973) a produção de proteases estava reprimida na presença de glucose. A protease extracelular de *Beauveria bassiana* encontra-se igualmente sujeita a esta regulação (Bidochka e Khachatourians, 1988).

A protease extracelular de *Aspergillus nidulans* é regulada por mecanismo coordenado de indução e repressão/ “desrepressão” na presença de glucose, amônia ou enxofre e é “desreprimida” na ausência de um destes constituintes (Cohen, 1972).

Em algumas espécies de fungos as proteinases não estão só sujeitas a repressão, mas podem ser induzidas por proteínas extracelulares (North, 1982).

Cohen et al. (1975) adicionaram soro albumina bovina no cultivo de *N. crassa* e observaram que as 2 proteases do fungo parecem ser coordenadamente reguladas por um simples sistema de indução e repressão no qual o sucesso da indução por proteínas exógenas depende da repressão por metabólito do carbono, do nitrogênio e do enxofre.

Bidochka e Khachatourians (1988), cultivaram o fungo *B. bassiana* em presença de gelatina e glucose e a produção de protease foi inibida nestas condições de cultivo. Assim sugerem que a produção de protease quando reportada por milígrama de proteína micelial é parcialmente regulada por glucose. Contudo ao

adicionar nitrato de amônia nas culturas contendo gelatina e glucose, a secreção de protease foi inibida, considerando a atividade da enzima reportada, agora por miligrama de peso micelial seco. Para esses autores os resultados sugerem que a produção de proteases é regulada por sistema complexo tipo da *Neurospora crassa*.

Ahman (1996), por análise de "Northern blots" demonstrou que a PII, uma serina protease extracelular do fungo *Arthrobotrys oligospora* que infecta nematódios, foi expressa quando o fungo cresceu em meio deficiente de nitrogênio e carbono e que a expressão foi significativamente estimulada pela adição no meio de várias proteínas solúveis e insolúveis, incluindo fragmentos de cutícula de nematódio. Os níveis de mRNA, bem como da atividade proteolítica de PII foram reprimida na presença de glucose e formas facilmente metabolizadas de nitrogênio, incluindo amônia, nitrato e aminoácidos.

Mester et al (1996), estudando a regulação de peroxidases extracelulares do fungo *Bjerkandera sp*, observaram que a protease extracelular formava-se na fase inicial de crescimento e a produção máxima ocorria em 150 horas, com os níveis de glucose em torno de 50 % e o meio suplementado com 19,8 mM de peptona como fonte de nitrogênio. Após esse tempo a atividade proteolítica decrescia e no tempo de 300 horas de crescimento surgia uma segunda atividade quando a glucose já estava depletada. Os resultados indicam que a secreção de protease durante a metabolismo primário por *Bjerkandera sp* é constitutivo; contudo quando as fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico estão presentes, o fungo preferencialmente assimila o nitrogênio orgânico.

Embora proteinases tenham sido estudadas em inúmeros fungos, são pouco conhecidas as enzimas produzidas pelos fungos ectomicorrízicos. Há algumas

evidências de que vários fungos ectomicorrízicos (Hutchison, 1990) apresentam atividade proteolítica sob indução com proteínas. A liquefação da gelatina foi observada por Hutchison quando estudava a classificação de micorrizas. Entre os fungos que apresentavam atividade estão: *Thelephora terrestris*, *Piloderma bicolor*, *Rozites caperata*, *Tricholoma resplendens* e *Boletus ornatipes*. Espécies de Amanita exibiram atividade de gelatinase, mas a intensidade da reação variou entre as espécies.

Portanto, o fungo ectomicorrízico *Thelephora terrestris* produziria proteases extracelulares em condições de indução.

## 2 OBJETIVOS

- a) caracterizar a atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris*;
- b) analisar os efeitos de diferentes condições de cultivo sobre os níveis de atividade enzimática de *Thelephora terrestris*;

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 MICRORGANISMO**

A amostra de *Thelephora terrestris* TT 223 usada foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Daison Silva da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.2 MATERIAIS**

Azocoll, azocaseína, azoalbumina, soro albumina bovina, glucose oxidase e peroxidase, PMSF, pCMB, E-64, pepstatina, iodoacetamida (Sigma), gel para eletroforese (Pharmacia), gelatina (Oxoid).

#### **3.3 MEIOS DE CULTURA**

Meio líquido MMN (Modifield Melin-Norkrans), composto de  $\text{CaCl}_2$  (0,05 g),  $\text{NaCl}$  (0,025 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,5 g),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,15 g), Tiamina/HCl (25  $\mu\text{g}$ ),  $\text{FeCl}_2$  1% (1,2 mL),  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1000 mL. Quantidade de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  e glucose variaram de acordo com o experimento. Para tornar o meio sólido foram acrescidos agar-agar (15 g) e Extrato de Malte (3,0 g), pH final 5,6 e autoclavado a uma atmosfera de pressão durante 30 minutos.

As soluções de glucose e  $\text{FeCl}_2$  foram esterilizados separadamente em vapor

fluente por 30 minutos e adicionados de modo asséptico ao meio.

As concentrações da fonte de carbono 27,75 mM e de amônia 3,4 mM foram selecionadas baseando-se na produção da massa micelial e na produção de enzimas.

A cultura estoque de *Thelephora terrestris* foi mantida em meio sólido e repicada bimensalmente. Os pré-inóculos foram obtidos por transferência dos micélios do meio sólido ao meio líquido MMN e cultivados durante 7 dias. O inóculo foi obtido a partir do pré-inóculo e padronizado através da relação entre densidade ótica (DO) e peso seco.

### 3.4 CURVA DE PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO

O meio cultivado durante 7 dias foi homogeneizado três vezes em liquidificador por 10 segundos. Diferentes diluições do material foram feitas e as absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 660 nm. Diferentes diluições filtradas em papéis de filtros previamente pesados e colocados em estufa a 60° C durante 5 dias, foram utilizadas para a determinação do peso seco. De 3 ensaios foi obtido uma média representada na curva da figura 1.

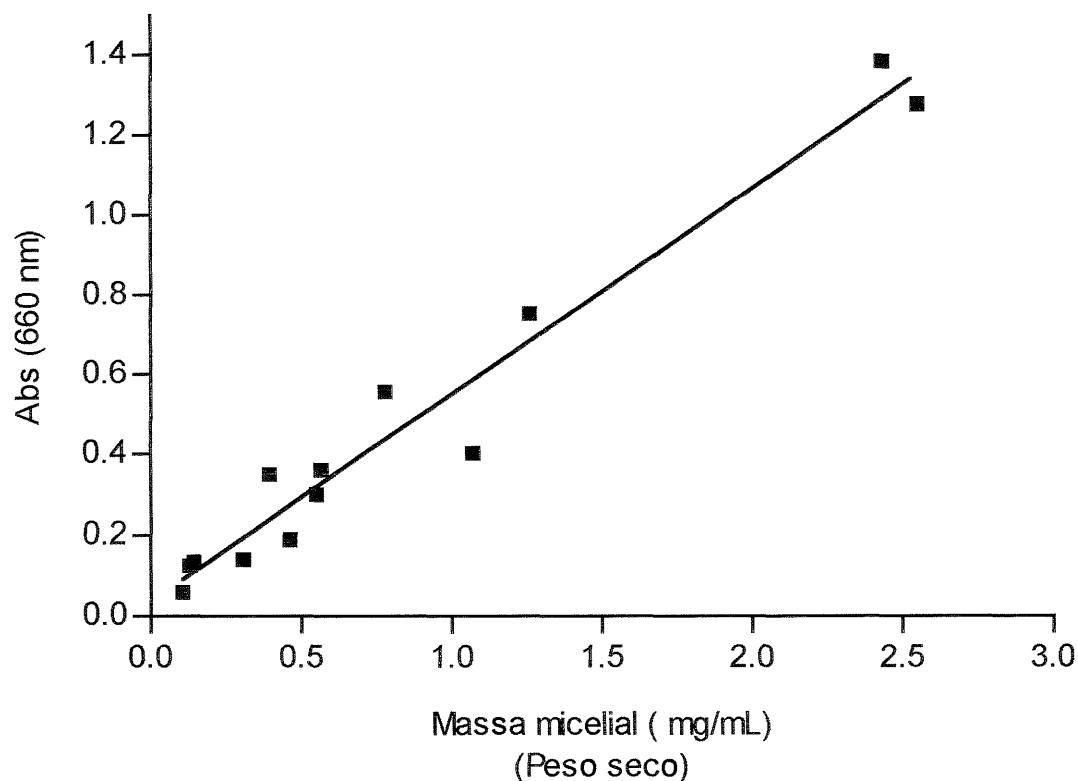


FIGURA 1: CURVA DE PADRONIZAÇÃO DE INÓCULO DE *Thelephora terrestris*

A curva representa a média de três ensaios conforme descrito em materiais e métodos 3.4.

### 3.5 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Thelephora terrestris*

O fungo *Thelephora terrestris* foi cultivado durante 120 horas em meio líquido MMN em agitador rotatório (New Brunswick Scientific Co.) a 120 rpm a 28° C e a cada 12 horas 2 frascos de 250 mL contendo 50 mL de meio eram retirados e filtrados em papel de filtro previamente pesados e levados a uma estufa a 60° C durante 5 dias. Após esse período foram novamente pesados e determinados desta forma os pesos secos das amostras.

### 3.6 CULTIVO COM E SEM AGITAÇÃO

Foram inoculados 14,6 mg de *Thelephora terrestris* em 50 mL de meio líquido MMN em Erlenmeyer de 250 mL contendo: 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio e cultivados durante 97 horas a 28° C, no escuro, sem e com agitação (New Brunswick Scientific Co.) a 120 rpm. Após esse tempo foram filtrados em papel de filtro previamente pesado e o filtrado obtido utilizados para as análises de atividade proteolítica, glucose e amônia residuais e proteína. A massa micelial foi levada para secar na estufa a 60° C durante 5 dias e determinado o peso seco. Os cultivos foram feitas em triplicatas e o resultado foi considerado como a média dos dados.

### 3.7 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE E FOSFATO DE AMÔNIO

Em 50 mL de meio líquido de MMN contendo concentrações variáveis de glucose e fosfato de amônio, em frascos de Erlenmeyer de 250 mL, foram inoculados concentrações padronizadas de inóculo de *Thelephora terrestris* e cultivadas sobre agitador rotatório (New Brunswick Scientific Co.) a 120 rpm e 28° C. A cada tempo determinado de crescimento, 2 frascos eram retirados, a massa micelial separada por filtração em papel de filtro previamente pesado, levado à estufa com 60° C durante 5 dias e determinado o peso seco. Os sobrenadantes (filtrados) foram utilizados para as análises de glucose e amônia residual, proteína e atividade enzimática. Após as determinações os filtrados foram congelados a -18° C. As curvas foram feitas em duplicatas.

### 3.8 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SULFATO DE MAGNÉSIO E SULFATO DE COBRE

Concentrações diferentes de sulfato de magnésio de 0,01 mM a 1,4 mM e sulfato de cobre de 1 a 10,0 mg/L foram adicionados ao meio de cultivo MMN, contendo 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio. Foram inoculado 2,1 mg de peso seco de *Thelephora terrestris* para o cultivo com diferentes concentrações de sulfato de magnésio e 6,76 mg para o cultivo com diferentes concentrações de sulfato de cobre, em 50 mL de meio líquido e cultivados por 96 e 144 horas a 28° C sob agitação. Após esse tempo foram filtrados em papel de filtro previamente pesado. Os filtrados foram utilizados para as análises de atividade

proteolítica, glucose e amônia residual e proteína. A massa micelial foi levada para secar em uma estufa a 60° C durante 5 dias e determinado o peso seco. Os cultivos foram feitas em duplicatas.

### 3.9 ENSAIO PARA GLUCOSE RESIDUAL

Foram ensaiadas 0,5 mL do meio de cultivo pelo método enzimático da glucose oxidase (Dahlqvist, 1961), tendo a glucose como padrão. A absorbância do ensaio foi medida em 420 nm (Espectrofotômetro Beckman DU 7400. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

### 3.10 ENSAIO PARA AMÔNIA RESIDUAL

A amônia residual foi ensaiada pelo método do indofenol (Chaney e Marbach, 1962) utilizando-se 0,5 mL do meio de cultivo e tendo o sulfato de amônio como padrão. A absorbância do ensaio foi medida a 625 nm com o espectrofotômetro Beckman DU 7400. Todos os ensaios foram realizadas em triplicatas.

### 3.11 DOSAGEM DE PROTEÍNAS

O volume de 0,5 mL do meio de cultivo dialisado por uma noite contra a água à temperatura de 4° C foi lyophilizado (HETO Dry GD-1-CT 110). A proteína do meio de cultivo concentrada foi dosada pelo método de Lowry et al. (1951), tendo como padrão soro albumina bovina. A absorbância do ensaio foi medida a 660 nm. Todas as análises foram feitas em triplicatas.

### 3.12 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASE EXTRACELULAR

A atividade proteolítica foi determinada usando diferentes substratos.

#### a. Azocaseína

Um mililitro do meio de cultivo dialisado por uma noite contra a água a 4° C, foi incubado a 40° C com 20 mg de azocaseína em 1 mL de tampão acetato 0,1 mM e pH 4,8. Ao branco, foi adicionado o TCA 10% no meio de cultivo antes da adição do substrato. A reação foi conduzida por 1 hora em banho-maria 40° C com agitação e interrompida por adição de 1 mL de Ácido Tricloroacético (TCA) a 10% gelado. O ensaio foi resfriado em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação, em centrifuga Eppendorf 5415C a 12000 rpm durante 6 minutos à temperatura ambiente. Foi removido 0,5 mL do sobrenadante e misturado com 0,5 mL de uma solução KOH 5N recentemente preparada. O aumento da absorbância a 428 nm foi determinado de acordo com Abbot e Marzluf (1984). Uma unidade de enzima foi definida como a concentração de enzima capaz de provocar a mudança na absorbância de 1,0 em 1 hora sob as condições de ensaio (Lilly et al., 1990).

#### b. Azocoll

Vinte miligramas de azocoll foi suspenso e misturado a 0,5 mL do tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8; água destilada na quantidade de 1,5 mL e 1,0 mL do meio de cultivo dialisado foram colocados em Erlenmeyer de 25 mL. O frasco foi incubado em banho-maria com agitador rotatório (120 rpm) por 1 hora a temperatura

de 40° C. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro; a absorção do filtrado foi medida a 520 nm (Espectrofômetro Beckman 7400). Uma unidade de proteolítica (PU) foi definida como a mudança na absorbância de 1,0 por 1 hora sob as condições de ensaio (Bidochka e Khachatourians, 1988).

Foram realizados controles com enzimas fervidas e as densidades óticas destes ensaios foram descontados da atividade contendo a enzima ativa.

Todas as determinações de atividade enzimática foram feitas em triplicatas.

### 3.13 INDUÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Ao meio líquido de cultivo MMN foram adicionados gelatina a 1% , gelatina a 1% com glucose a 1% e gelatina a 1% com fosfato de amônio 8,9 mM. A 50 mL dos meios foram adicionados 7,76 mg do inóculo de *Thelephora terrestris* e cultivados durante 72 horas sob agitação a 28° C. O mesmo inóculo de *Thelephora terrestris* foi adicionado em meio MMN sem gelatina e cultivado nas mesmas condições como controle. Após esse tempo, as amostras foram filtradas em papéis de filtros previamente pesados e levados a estufa a 60° C durante 5 dias para determinação do peso seco. A atividade proteolítica, e os teores de glucose e amônia residuais e proteína foram determinados no meio de cultivo filtrado. Os cultivos foram feitas em duplicita.

Os ensaios de caracterização da atividade proteolítica de *Thelephora terrestris* foram todas feitos em cultivos induzidos com gelatina a 1% em presença de glucose a 1%.

### 3.14 ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUBSTRATOS

Os substratos coloridos testados foram azocoll, azocaseína e azoalbumina. Diferentes concentrações (2 a 20 mg) destes substratos foram dissolvidos em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8, ensaiados com 1 mL de meio de cultivo dialisado e incubados por 1 e 4 horas a 40° C. Após esses tempos foram adicionados 1 mL de TCA 10% gelado ao ensaio e mantido os tubos em banho de gelo. Foram em seguida transferidos ao tubo Eppendorf e centrifugados por 6 minutos em centrífuga Eppendorf e aos sobrenadantes azocaseína e azoalbumina foram adicionados 1 mL de KOH 5N. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 428 nm para azocaseína e azoalbumina e 520 nm para o azocoll.

### 3.15 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO

Um mililitro do meio de cultivo dialisado foi incubado com concentrações variáveis de azocaseína (1 a 30 mg) em 1 ml de tampão acetado de sódio 0,1M e pH 4,8 a 40° C por diferentes tempos: 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas. Após esses tempos foram adicionados 1 mL de TCA 10% gelado e mantido o ensaio em banho de gelo. O precipitado foi removido por centrifugação em aparelho Eppendorf a 12000 rpm por 6 minutos à temperatura ambiente. Foi removido 0,5 mL do sobrenadante e misturado com 0,5 mL de KOH 5N. A absorbância foi medida em 428 nm. Os valores utilizados na determinação do Km aparente correspondiam às tangentes das curvas de tempo de cada concentração. Os parâmetros cinéticos de Km para o substrato azocaseína foram estimados com a equação de Michaelis-

Manten pelo programa ENZ-FIT.

### 3.16 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E A ESTABILIDADE DAS PROTEASES EXTRACELULARES

a. Em um mililitro do meio de cultivo dialisado foi adicionado: tampão acetato de sódio 0,1 M, variando o pH da mistura entre pH 4,0 a 6,0; tampão citrato de sódio 0,05 M entre pH 3,2 a pH 5,8; tampão fosfato de sódio 0,1 M entre pH 6,0 a pH 8,0; tampão glicina/NaOH 0,1 M entre pH 8,0 a 10,6; e tampão glicina/HCl entre pH 2,2 a pH 3,2. Em seguida foram incubados com 20 mg de azocaseína durante 1 hora à temperatura de 40° C sob agitação. Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no item 3.12.a.

b. A estabilidade da atividade proteolítica à diferentes pH foi determinada adicionando-se a 1 mL do meio de cultivo dialisado (pH de 4,8), um mL de diferentes tampões nas concentrações indicadas, ajustando-se o pH das misturas para as faixas de pH 3,0 a 9,5 com NaOH ou HCl em potenciômetro. Foram deixados por 24 horas a 4° C nos diferentes pH. Após esse período os pH foram ajustados ao pH 4,8 para a medida da atividade enzimática conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a. O pH foi medido em potenciômetro da Micronal pHmetro B374.

### 3.17 TEMPERATURA ÓTIMA E ESTABILIDADE TÉRMICA

a. O ensaio para a temperatura ótima foi feito incubando-se meio de cultivo dialisado em tampão acetato de sódio 0,1 M, pH 4,8 e 20 mg do substrato azocaseína em diferentes temperaturas (de 20° C a 70° C) por 1 hora e determinada a atividade enzimática conforme descrito no item 3.12.a.

b. A estabilidade da atividade proteolítica frente a temperatura foi determinada, incubando o meio de cultivo dialisado em várias temperaturas por diferentes tempos. Após este procedimento o meio de cultivo foi resfriado e a atividade enzimática medida conforme especificado no item 3.12.a.

### 3.18 INIBIDORES DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

O efeito de inibidores sobre a atividade proteásica foi determinada incubando-se as amostras em diferentes inibidores com concentrações previamente determinadas, à temperatura ambiente por 1 hora antes do ensaio. O controle da amostra continha um volume de água equivalente e foi pré-incubada nas mesmas condições. Após esse tempo as amostras foram ensaiadas conforme o descrito no item 3.12.a. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

As soluções estoques de EDTA, EGTA, Iodoacetamida, p-Cloromercuriobenzoato e o E-64 foram preparadas em água. Os inibidores pepstatina e PMSF foram dissolvidas em etanol.

### 3.19 ENSAIO PARA REVERSÃO DE INIBIÇÃO

Para reverter a ação dos inibidores do grupo SH e o quelante de metais EDTA, um mL do meio de cultivo foi incubada com os respectivos inibidores por 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período foram adicionadas 50 mM de cisteína/HCl e  $\beta$ -mercaptoetanol para reverter o processo de inibição dos grupos SH. Já para reversão de inibição por EDTA, foram adicionados 0,15 mL das soluções de  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  na concentração de 1M e 0,30 mL de  $\text{Zn}^{++}$  0,5 M e 0,35 mL de tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8. Após esses procedimentos, foram incubados por 4 hora à temperatura ambiente e ensaiadas conforme o descrito no item 3.12.a.

### 3.20 ENSAIO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CISTEÍNA/HCl

Um mililitro do meio de cultivo dialisado foi incubado com concentrações de 0,10 a 1,00 mM de cisteína/HCl durante 15 minutos. Após esse tempo a atividade enzimática foi ensaiada conforme descrito no item 3.12.a.

### 3.21 ENSAIO COM CÁTIONS PARA A ATIVAÇÃO DA ENZIMA PROTEÁSICA

Soluções de 1 mM com os seguintes cátions:  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{CoCl}_2$  e  $\text{NaCl}$  foram preparadas com água MiliQ para o ensaio de ativação da enzima por cátions. A 1 mL do meio de cultivo previamente dialisado foram adicionados 0,15 mL de cada íon 1mM (concentração final de 0,1 mM), 0,35 mL de

tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8 e incubou-se por 15 min à temperatura ambiente. Após esse período a atividade enzimática foi ensaiada adicionando-se 20 mg substrato azocaseína dissolvida em tampão acetato de sódio para um volume final de 2,0 mL, conforme descrito no item 3.12.a. Um ensaio sem os íons e outro com enzimas fervidas foram feitos como controle para cada procedimento.

### 3.22 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS E NATIVO

As eletroforeses em gel de poliacrilamida SDS foram feitas no aparelho Phastsystem (Pharmacia LKB Biotechnology). Os padrões de altas massas moleculares (Sigma) utilizados foram: miosina de músculo de coelho (205 kDa);  $\beta$ -galactosidase de *E. coli* (116 kDa); fosforilase B de músculo de coelho (97 kDa); frutose-6-fosfato de músculo de coelho (84 kDa); soro albumina bovina (66 kDa); desidrogenase glutâmica de fígado bovino (55 kDa); ovo albumina (45 kDa) e gliceraldeído de músculo de coelho (36 kDa). Os padrões de baixas massas moleculares foram: soro albumina bovina (66 kDa); ovo albumina (45 kDa); gliceraldeído-3-fosfato (36 kDa); anidrase carbônica de eritrócitos (29 kDa); tripsinogênio de pâncreas bovino (24 kDa); tripsina (20 kDa) e aprotinin (6,5 kDa).

As amostras, contendo 2  $\mu$ g de proteínas, foram liofilizadas e receberam 4  $\mu$ l do tampão Tris HCl pH 6,8 contendo glicerol 10% (v/v), SDS 10%,  $\beta$ -mercaptoetanol e azul de bromofenol 0,05%. As amostras com tampão foram fervidas durante 5 minutos e 4  $\mu$ l foram aplicados sobre o gel gradiente de 4-15 % e analisadas no Phastsystem nas condições especificadas no catálogo do aparelho. Feito isto o gel foi corado com nitrato de prata pelo método optimizado para SDS-PAGE,

programado no método descrito no catálogo do aparelho Phastsystem da Pharmacia.

A análise da atividade proteásica em condições não desnaturante foi realizada num gel de poliacrilamida a 7,5% contendo 0,5% de gelatina em cuba vertical em aparelho Bio Rad Mini Protean II. As amostras foram lyophilizadas (lyofilizador HETO) e misturadas em partes iguais com o tampão 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina pH 8,3 contendo 10% (v/v) de glicerol, 0,005% de azul de bromofenol e aplicadas no gel e analisado com tampão de corrida 0,025 M de Tris e 0,192 M de glicina pH 8,3, numa corrente constante de 10 mA (100V) a 4° C, por 2 horas e 45 minutos. Em seguida o gel foi incubado por 5 horas em tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 4,8 à uma temperatura de 40° C, para a digestão da gelatina pela protease. Após esse tempo o gel foi corado com 0,1% de Coomassie Blue em 40% (v/v) de metanol e 10% (v/v) ácido acético, por uma noite e descorado com metanol, ácido acético e água (3:1:6).

### 3.23 CROMATOGRAFIA EM CM-CELULOSE

Ao meio de cultivo foram adicionados etileno glicol na concentração final de 5% e concentrado 30 vezes sob nitrogênio, em célula de Amicon com uma membrana PM 30. Após este procedimento, a amostra concentrada foi dialisada contra tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8 por uma noite a 4° C.

Foi passada 1,8 mL da amostra dialisada numa coluna de 2/15 cm de CM-celulose equilibrada com tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8 contendo etileno glicol a 5%. A coluna foi eluída com um volume de tampão acetato de sódio 0,1 M e

pH 4,8 até a absorbância a 280 nm ser zero e foi novamente eluída com NaCl 1 M no mesmo tampão. O fluxo da coluna foi de 2 mL min<sup>-1</sup>. Os picos de proteínas monitorados a 280 nm foram concentrados por ultrafiltração, ensaiados para atividade enzimática e analisados em eletroforese nativa e em SDS. A amostra eluída com 1,0 M de NaCl foi dialisada por uma noite com tampão acetato de sódio 0,025 M e pH 4,8 e etileno glicol a 5% antes dos ensaios de atividade e eletroforese.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE *Thelephora terrestris*

Nas condições de 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio no meio de cultivo MMN, o fungo entrou em crescimento estacionário a partir de 48 horas, mantendo os mesmos níveis até 120 horas, como demonstram os dados da figura 2.

### 4.2 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA FRENTE A DIFERENTES SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

Os dados da tabela 1 mostram que o substrato azocaseína nas condições de ensaio é hidrolizado preferencialmente pela atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris*. A azoalbumina também é degradada, sendo no entanto de ação mais lenta e o azocoll, um derivado desnaturado do colágeno, não é facilmente digerido por esta enzima, nestas mesmas condições.

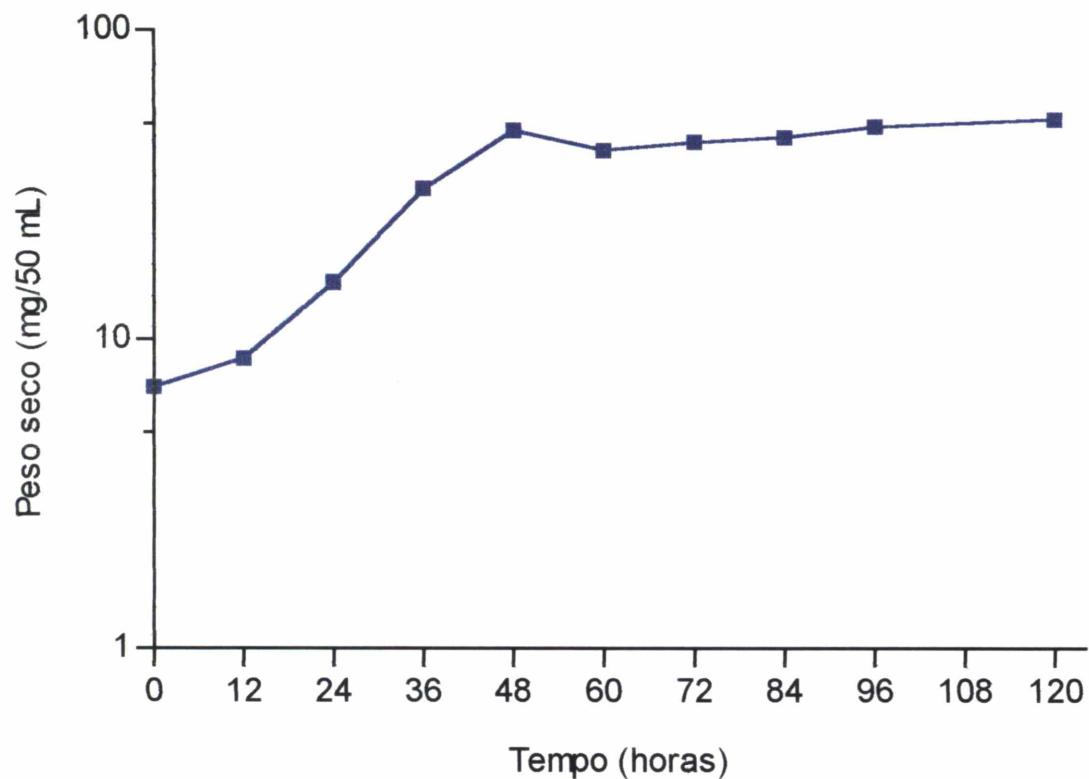


FIGURA 2: CURVA DE CRESCIMENTO DE *Thelephora terrestris*

Inóculos de 7,0 mg de *Thelephora terrestris* foram acrescentados em 50 mL de meio MMN contendo 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivados por 120 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C. A curva representa a média de dois ensaios conforme descrito em materiais e métodos 3.5.

TABELA 1: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA *Thelephora terrestris* COM DIFERENTES SUBSTRATOS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

	1 hora				4 horas			
	2 mg	5 mg	10 mg	20 mg	2 mg	5 mg	10 mg	20 mg
Azocaseína (U/mL)	0,218	0,413	0,725	0,895	0,328	0,511	1,034	1,579
Azoalbumina (U/mL)	0,015	0,027	0,068	0,111	0,027	0,075	0,209	0,413
Azocoll (U/mL)	-	-	0,016	0,023	-	-	0,045	0,033

Diferentes concentrações de substratos foram ensaiadas em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 pelo tempo de 1 hora e 4 horas a 40° C. A produção de enzima foi induzida com gelatina 1% no meio de cultura.

Concentração de proteínas extracelulares: 2,85 mg/mL

Os resultados representam a média dos ensaios dosados em triplicatas conforme descrito em materiais e métodos 3.14.

#### 4.3 EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DA PROTEASE

Os níveis das atividades proteolíticas foram nove vezes maiores no cultivo com agitação e consequente aeração, do que sem agitação (tabela 2). A massa micelial teve um aumento 3,5 vezes em relação a cultura sem agitação. A glucose e o amônia foram praticamente consumidos no meio com aeração, restando 20% de glucose e 25% de amônia no meio sem agitação. Já a produção de proteína foi 1,6 vezes maior em agitação do que no meio sem agitação. A produção de protease extracelular foi de 0,70 U/mg de peso de micélio.

Considerando que não houve secreção detectável de enzima nos cultivos estacionários pode-se inferir que a aeração do meio seja fundamental para o aparecimento da enzima extracelular.

TABELA 2: EFEITO DA AGITAÇÃO SOBRE A PRODUÇÃO DE ENZIMA PROTEOLÍTICA PELA *Thelephora terrestris*

	Massa micelial (mg/100mL)	Protease (U/mL)	Glucose residual (mM)	Amônia residual (mM)	Proteína extracelular (mg/mL)
Com agitação	135,8	0,9579	0,51	0,011	0,0840
Sem agitação	30,63	nd	6,0	3,6	0,0306

nd = não detectado

Inóculos de 14,6 mg de *Thelephora terrestris* foram acrescentados em 100 mL de meio MMN contendo 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivado por 97 horas com e sem agitação a 120 rpm a 28° C.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de três ensaios dosados em triplicatas conforme descrito em materiais e métodos 3.6.

#### 4.4 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE GLUCOSE SOBRE OS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

A figura 3 apresenta a variação da massa micelial do fungo *Thelephora terrestris* em diferentes concentrações de glucose, em função do tempo de crescimento. O fungo entrou em crescimento estacionário em 72 horas em todas as concentrações de glucose.

A glucose foi exaurida em 144 horas (figura 6) para as concentrações de 19,98 mM e 27,75 mM e em 216 horas nas concentrações de 41,60 mM e 55,50 mM ainda havia presença de glucose residual.

Os dados da figura 5 mostram aumento crescente da secreção de proteínas atingindo o máximo em 144 horas, em todas as concentrações de glucose. Após este tempo observa-se uma queda na produção de proteínas, mantendo-se nesses níveis até 216 horas.

A atividade proteolítica extracelular variou em função da concentração da fonte de carbono (figura 4). A atividade específica da protease variou em função da concentração de proteínas extracelulares, sendo maior em 168 horas. Os níveis da atividade proteolítica extracelular independem da exaustão da fonte de carbono.

A atividade específica considerando a massa micelial manteve-se na mesma ordem de grandeza em todas as concentrações de glucose utilizadas.

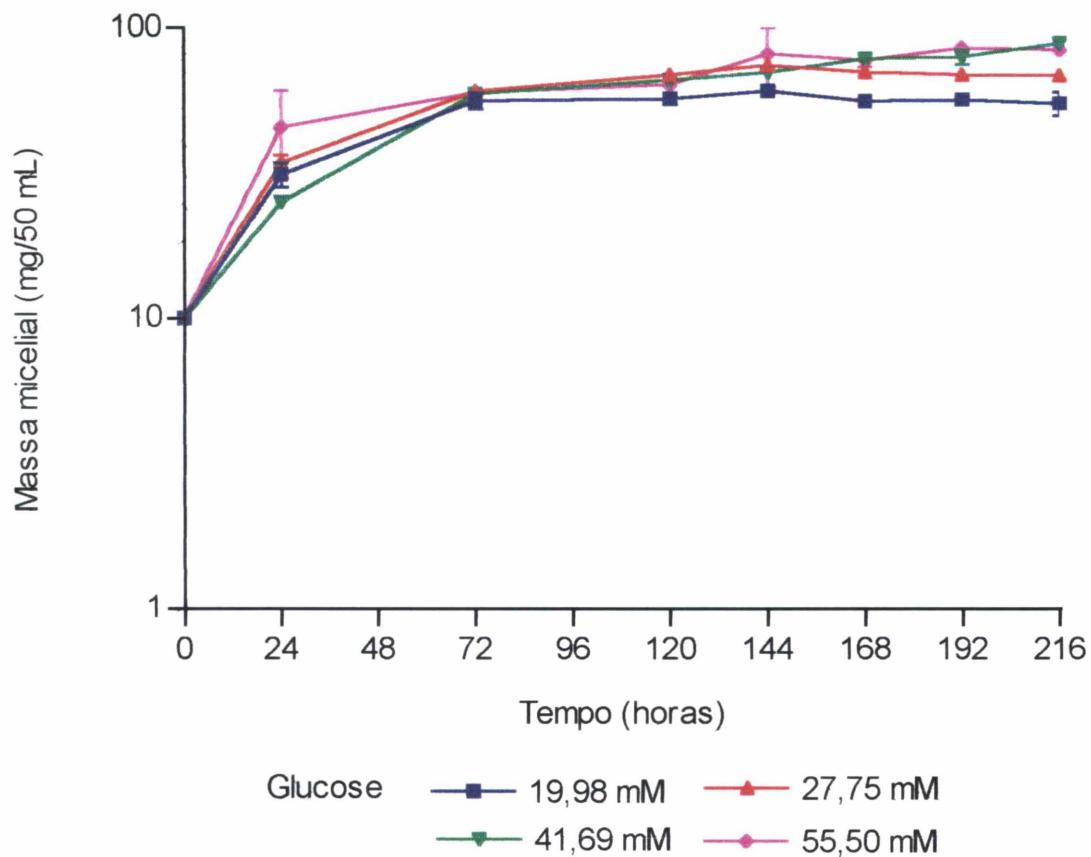


FIGURA 3: CURVA DE CRESCIMENTO DE *Thelephora terrestris* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

Inóculos de 10,2 mg de *Thelephora terrestris* foram acrescentados em 50 mL de meio MMN contendo diferentes concentrações de glucose e 2,21 mM de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivados por 216 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios conforme descrito em materiais e métodos 3.7.

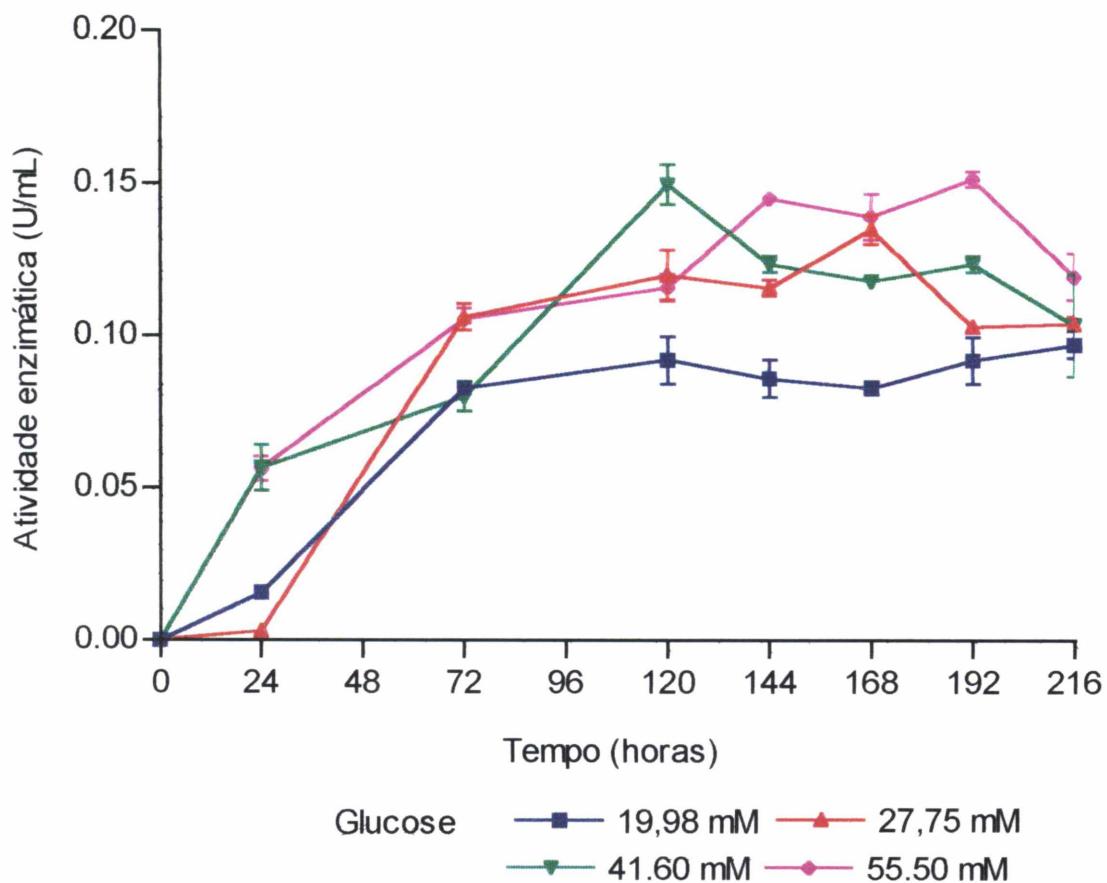


FIGURA 4: NÍVEIS DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

Um mL do meio de cultivo dialisado foi ensaiada com 20 mg de substrato azocaseina em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,8 sob agitação por 1 hora a 40° C.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

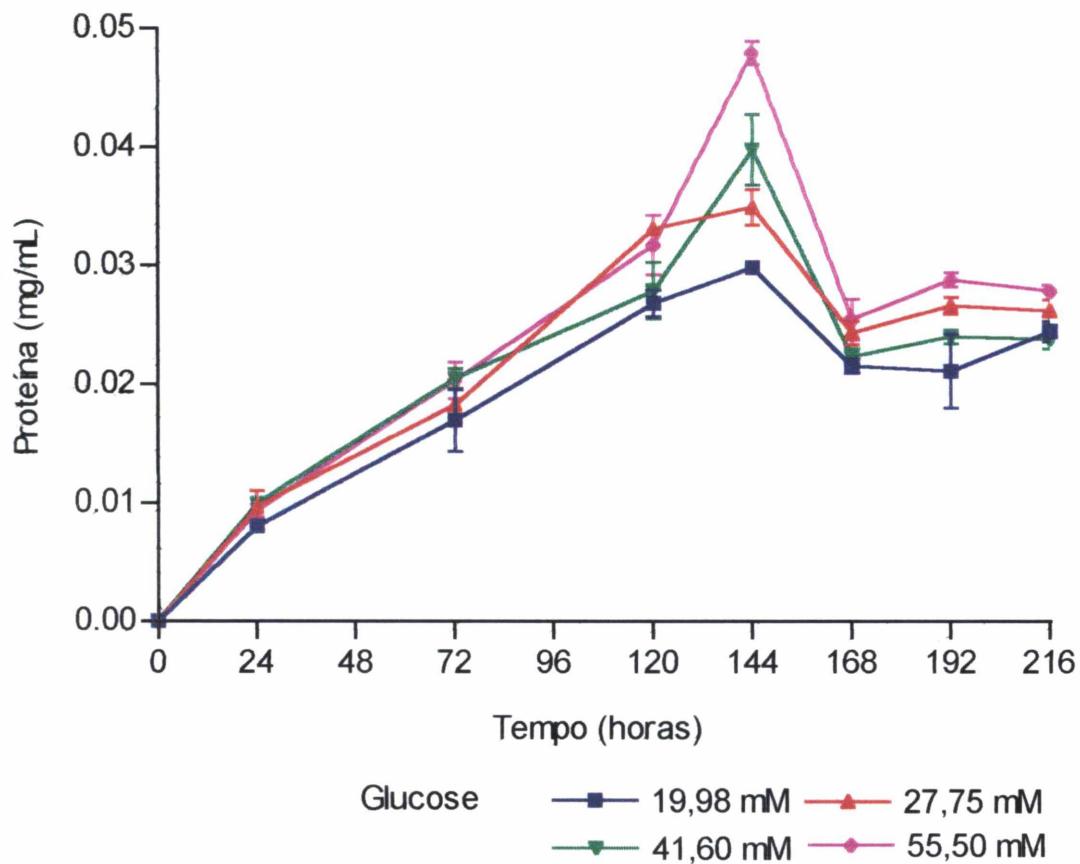


FIGURA 5: SECREÇÃO DE PROTEÍNAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

O resultado representa a média de dois ensaios dosado em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.11.

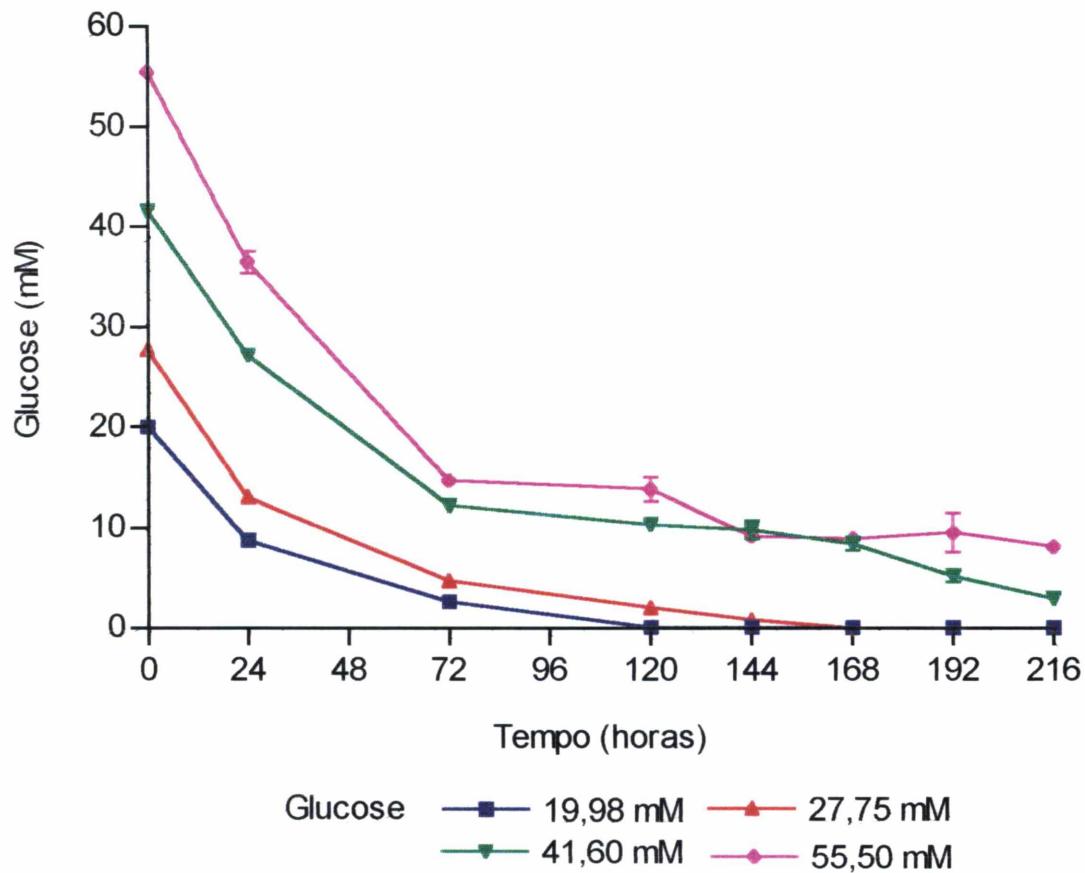


FIGURA 6: DOSAGEM DE GLUCOSE RESIDUAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GLUCOSE

O resultado representa a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.9

#### 4.5 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO DE AMÔNIO SOBRE OS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

Os dados da figura 7 mostram que o crescimento do fungo *Thelephora terrestris* foi proporcional à concentração de fosfato de amônio. O fungo entrou em crescimento estacionário após 72 horas em todas às concentrações de fosfato de amônio, por exaustão da fonte de nitrogênio (figura 10). Observa-se a presença de amônia novamente a partir de 120 horas de crescimento, quando os níveis de proteína extracelular decresceram.

Na figura 08 verifica-se a proporcionalidade dos níveis de atividade proteolítica em função da concentração de amônia do meio. Em altas concentrações de nitrogênio, os níveis se mantiveram altos após 72 horas de cultivo. Observa-se uma maior produção de proteases quando a relação carbono/nitrogênio foi de 22:1.

Os dados da figura 09 demonstram a secreção de proteínas, onde se observa uma maior produção em 72 horas para todas as concentrações de nitrogênio. Esta produção coincide com o pico de produção de protease (figura 08) e de massa micelial (figura 7).

Em concentrações superiores a 3,7 mM de fosfato de amônio a atividade proteolítica encontra-se reprimida em torno de 50% considerando a variação da massa micelial (tabela 3).

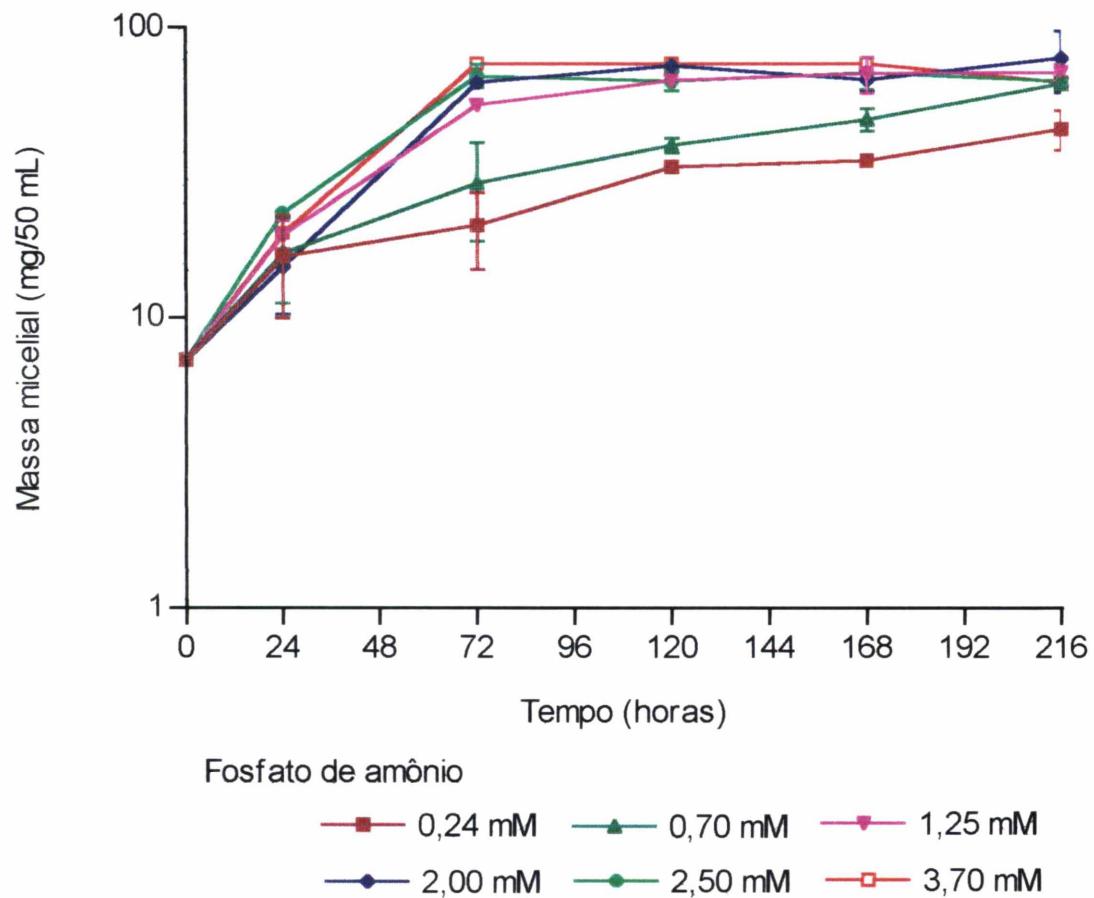


FIGURA 7: CURVA DE CRESCIMENTO DE *Thelephora terrestris* EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO

Inóculo de 7,76 mg de *Thelephora terrestris* foram acrescentados em frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio MMN com diferentes concentrações de fosfato de amônio e 27,75 mM de glucose cultivados sob agitação a 120 rpm por 216 horas a 28° C.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios conforme descrito em materiais e métodos 3.7.

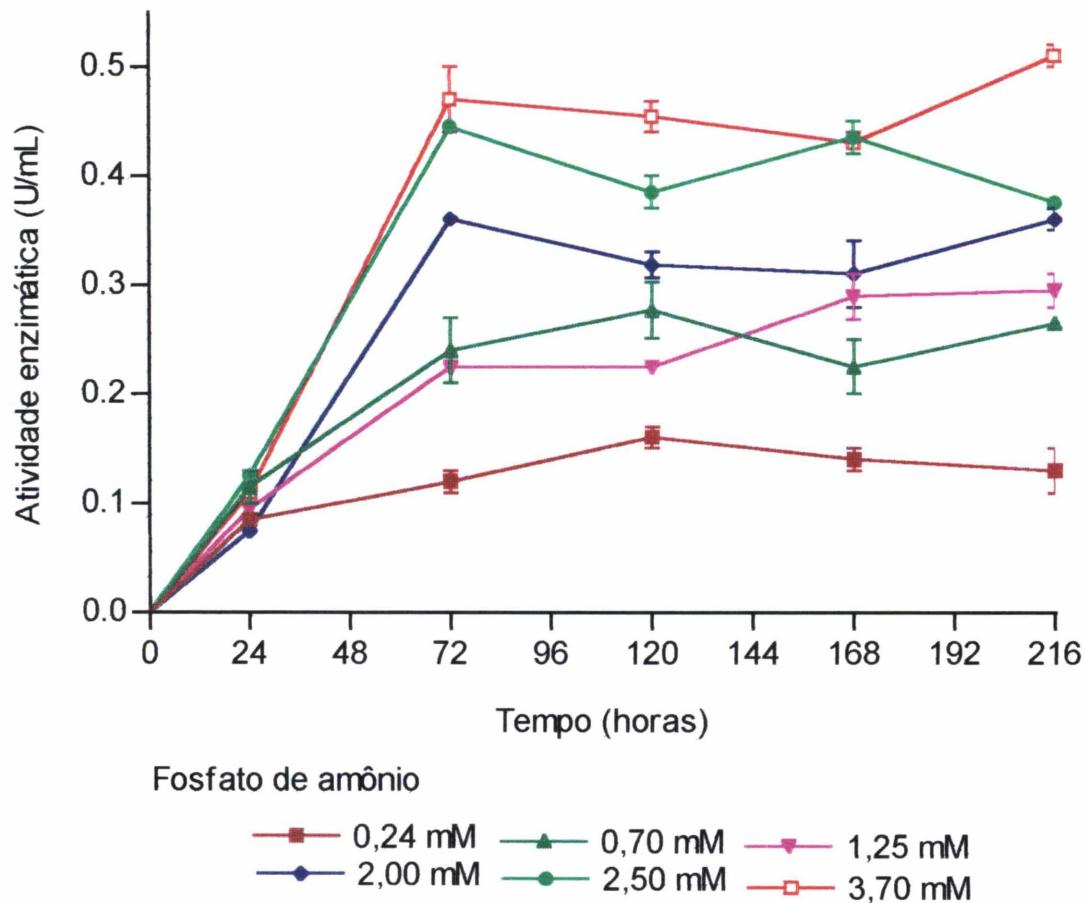


FIGURA 08: NÍVEIS DE ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO

Um mL do meio de cultivo dialisado foi ensaiado, incubando 20 mg de substrato azocaseina em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 sob agitação por 1 hora a 40° C.

O resultado representa a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

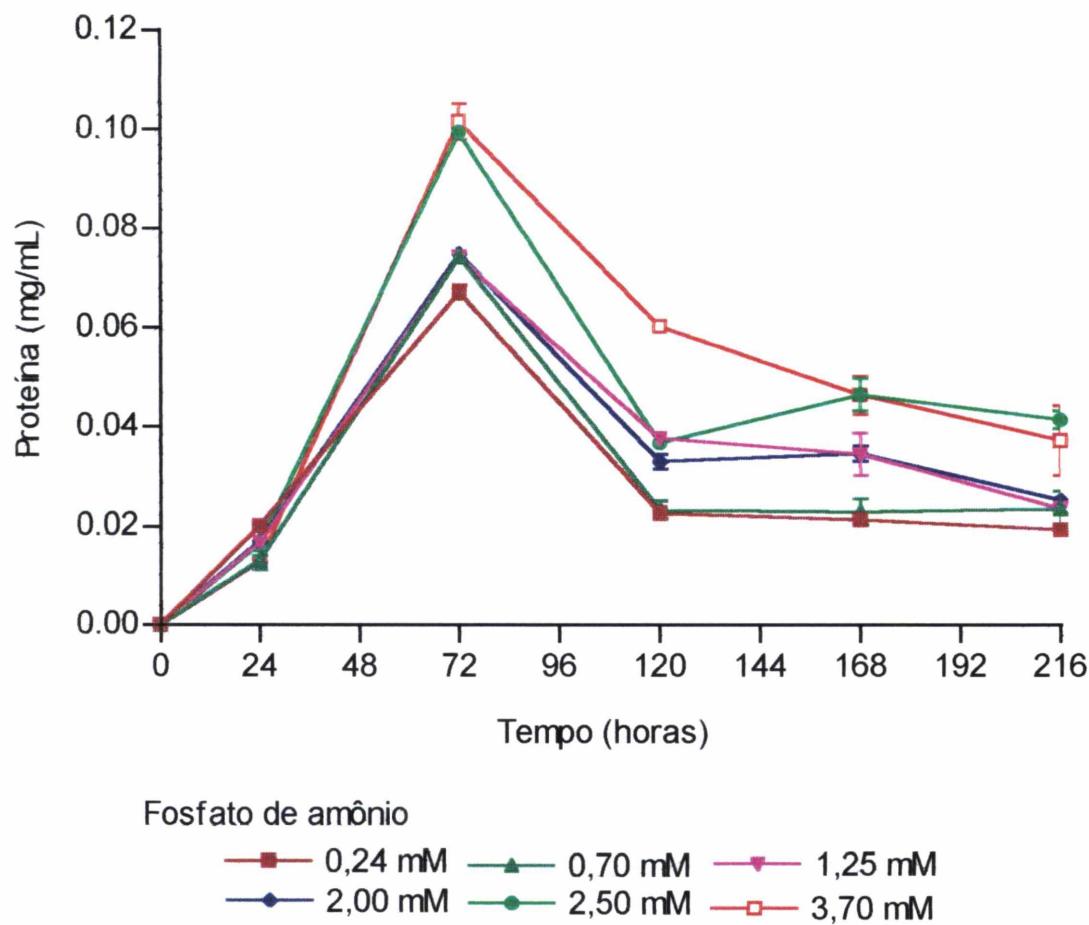


FIGURA 09: PROTEÍNA DO MEIO DE CULTURA EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO

O resultado representa a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.11.

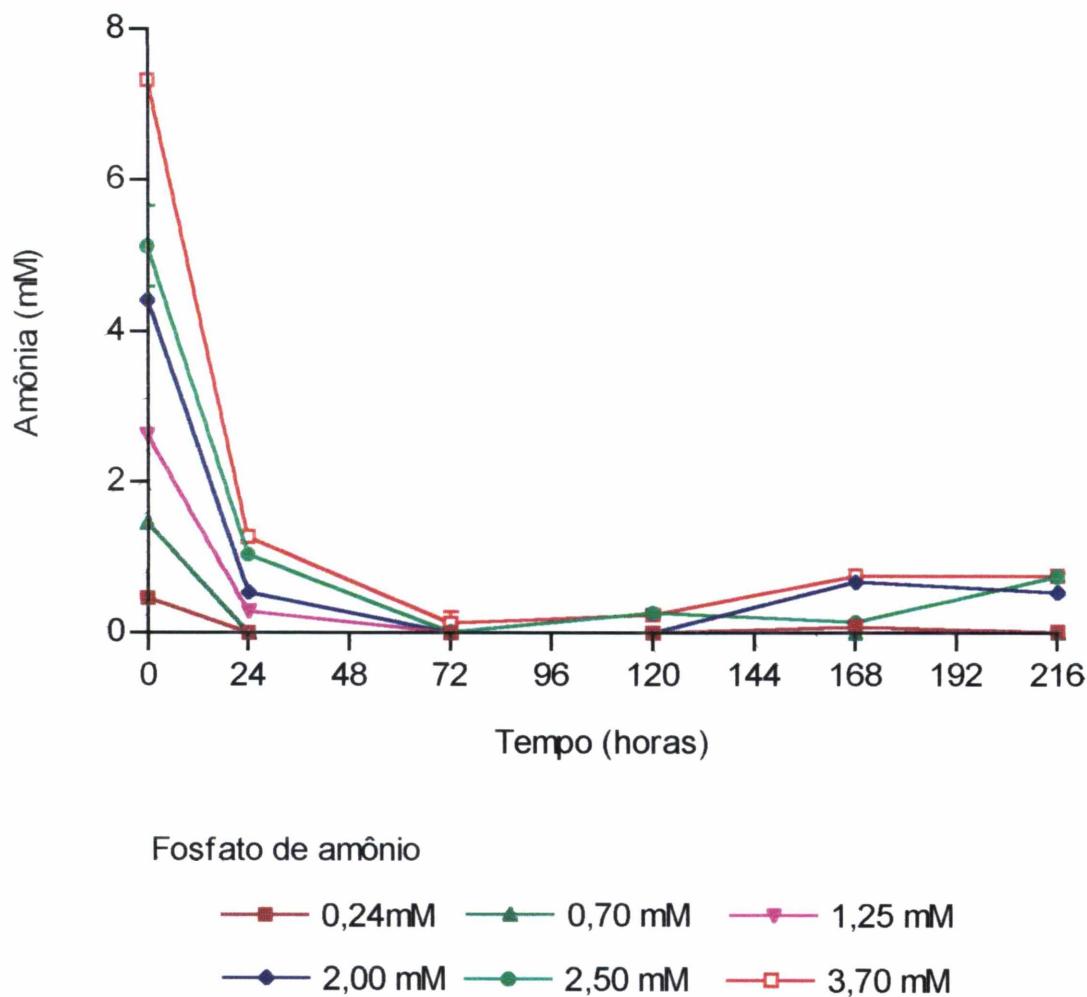


FIGURA 10: DOSAGEM DE AMÔNIA RESIDUAL EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE FOSFATO DE AMÔNIO

O resultado representa a média de dois ensaios dosado em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.10.

TABELA 3: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE FOSFATO DE AMÔNIO SOBRE A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DE *Thelephora terrestris*

Concentração de $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$	Massa micelial (mg/50 mL)	Protease (U/mL)	Proteína extracelular (mg/mL)	Glucose residual (mM)	Amônia residual (mM)
3,7 mM	69,6	0,7219	0,0792	2,33	0,014
6,7 mM	62,75	0,2815	0,0858	3,50	0,044
8,7 mM	51,45	0,3480	0,0823	2,60	2,4
11,2 mM	67,7	0,3496	0,0867	1,22	4,3

Inóculo de 7,3 mg de *Thelephora terrestris* foi acrescentado em 50 mL de meio MMN contendo 27,75 mM de glucose e diferentes concentrações de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivado por 72 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C.

O pH final do ensaio foi em torno de 2,5.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata.

#### 4.6 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE MAGNÉSIO E DE SULFATO DE COBRE NOS NÍVEIS DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR

A tabela 4 mostra a produção de protease em diferentes concentrações de enxofre. Não se observa diferenças significativas quanto a produção de massa micelial; o consumo de nitrogênio foi maior nas concentração menores de sulfato de magnésio, embora na concentração de 0,013 mM observa-se presença de amônia residual. Com a variação de 100 vezes na concentração de sulfato de magnésio, a atividade proteolítica assim como a quantidade de proteína aumentaram em 20% e 35% respectivamente.

Os dados apresentados na tabela 5 demonstram que o aumento da concentração de cobre não interfere significativamente na secreção de proteínas. A massa micelial obtida para todas as concentrações foi praticamente igual. O consumo de amônia e glucose foram semelhantes em todas as concentrações de sulfato de cobre no meio. No entanto, a atividade proteolítica mostrou a tendência à diminuição com o aumento da concentração de cobre.

TABELA 4: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SULFATO DE MAGNÉSIO NOS NÍVEIS DA PROTEASE EXTRACELULAR

Concentração de MgSO <sub>4</sub> (mM)	Glucose residual (mM)	Amônia residual (mM)	Protease (U/mL)	Proteína extracelular (mg/mL)	Massa micelial (mg/50 mL)
0,013	0,15	2,81	0,386	0,037	64,0
0,2	2,43	nd	0,378	0,038	57,7
0,4	1,86	nd	0,320	0,035	59,3
0,6	0,338	nd	0,346	0,038	66,6
0,8	nd	0,145	0,304	0,034	66,0
1,0	0,0145	0,466	0,413	0,044	61,9
1,2	0,0164	0,522	0,425	0,047	63,3
1,4	0,0164	0,594	0,460	0,050	66,1

nd = não detectado

Inóculo 2,1 mg de *Thelephora terrestris* foi acrescentado em 50 mL de meio MMN contendo 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivado por 144 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.8.

TABELA 5: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE SULFATO DE COBRE NOS NÍVEIS DA PROTEASE EXTRACELULAR

Concentração de CuSO <sub>4</sub> (mg/L)	Massa micelial (mg/50 mL)	Protease (U/mL)	Amônia residual (mM)	Glucose residual (mM)	Proteína extracelular (mg/mL)
Sem adição	33,6	0,395	0,031	9,70	0,036
1,0	29,25	0,270	0,029	9,76	0,029
1,5	35,40	0,221	0,0247	8,19	0,030
2,0	31,80	0,209	0,0256	7,93	0,028
2,5	36,80	0,163	0,0380	7,55	0,030

Inóculo de 6,76 mg de *Thelephora terrestris* foi acrescentado em 50 mL de meio MMN contendo 27,75 mM de glucose e 3,4 mM de fosfato de amônio em Erlenmeyer de 250 mL e cultivado por 96 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.8.

#### 4.7 INDUÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EXTRACELULAR COM GELATINA

Os dados da tabela 6 indicam que o fungo cultivado em meio ao qual foi adicionado gelatina + glucose, apresenta um aumento de massa micelial. Esse aumento foi de 6,6 e 5,4 vezes em relação ao cultivado em MMN + glucose e gelatina respectivamente. A presença de amônia residual foi maior no meio com gelatina e fosfato de amônio, já que a gelatina é também uma fonte de nitrogênio. A determinação de glucose residual demonstra que em 72 horas de crescimento havia cerca de 40% no meio com gelatina + glucose comparado ao controle contendo somente glucose.

Utilizando a gelatina como fonte de carbono e nitrogênio, os níveis de protease mostraram um aumento de 1,5 vezes em relação ao meio mínimo contendo glucose. Com a adição de gelatina ao meio com glucose, o nível da atividade enzimática aumentou 2,83 vezes em U/mL. Quando se correlaciona a atividade enzimática em função da massa micelial se observa que a glucose provoca, no meio com gelatina, uma diminuição da secreção da enzima. A adição de amônia não altera esta relação.

TABELA 6: INDUÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES EXTRACELULARES EM *Thelephora terrestris*

Meio de cultivo <sup>a</sup>	Massa micelial (mg/50 mL)	Protease (U/mL)	Amônia residual (mM)	Glucose residual (mM)	Proteína extracelular (mg/mL)
Controle	33,0	0,1699	0,033	0,88	0,076
MMN + glu					
Gelatina <sup>b</sup>	39,0	0,4245	1,81	0,092	2,635
Gelatina + glu <sup>c</sup>	251,0	0,6512	2,32	11,075	3,72
Gelatina + NH <sub>4</sub> <sup>d</sup>	33,0	0,3577	28,53	0,136	3,652

<sup>a</sup> Foi acrescentado 7,76 mg de inóculo de *Thelephora terrestris* no meio MMN + 0,5% de glucose e cultivado por 72 horas sob agitação a 120 rpm a 28° C.

<sup>b</sup> O meio gelatina corresponde ao meio MMN sem fonte de glucose e nitrogênio inorgânico e acrescido de gelatina a 1%.

<sup>c</sup> O meio gelatina + glu corresponde ao meio gelatina a 1% acrescido de glucose a 1%.

<sup>d</sup> O meio gelatina + NH<sub>4</sub> corresponde ao meio gelatina a 1% acrescido de fosfato de amônio 8,9 mM.

A massa micelial está expressa em peso seco.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.13.

#### 4.8 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES VOLUMES DE MEIO DE CULTIVO

Nos dados da figura 11 verifica-se que a atividade proteolítica é proporcional ao volume do meio de cultivo. O maior valor de hidrólise da azocaseína foi obtido com 1 mL do meio induzido com gelatina. A reação foi proporcional ao tempo de 8 horas de incubação (figura 12).

#### 4.9 EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE E ESTABILIDADE DA PROTEASE EXTRACELULAR

Os dados da figura 13 mostram a atividade proteásica frente a diferentes pH e diferentes tampões, onde o pH ótimo para a atividade proteásica foi 4,8 em tampão acetato de sódio 100 mM e citrato de sódio 50 mM. A atividade diminui nos pH abaixo de 4,0 e acima de 6,0.

Na figura 14 observa-se que a estabilidade da atividade enzimática é pouco afetada na faixa entre pH 4,6 a 5,6 para o tampão acetato de sódio 100 mM. No entanto, em tampão ácido cítrico/citrato de sódio 50 mM, na mesma faixa de pH, não se observa o mesmo efeito. A protease não é estável em pH abaixo de 4,0 e acima de 5,8, diminuindo com aumento do pH.

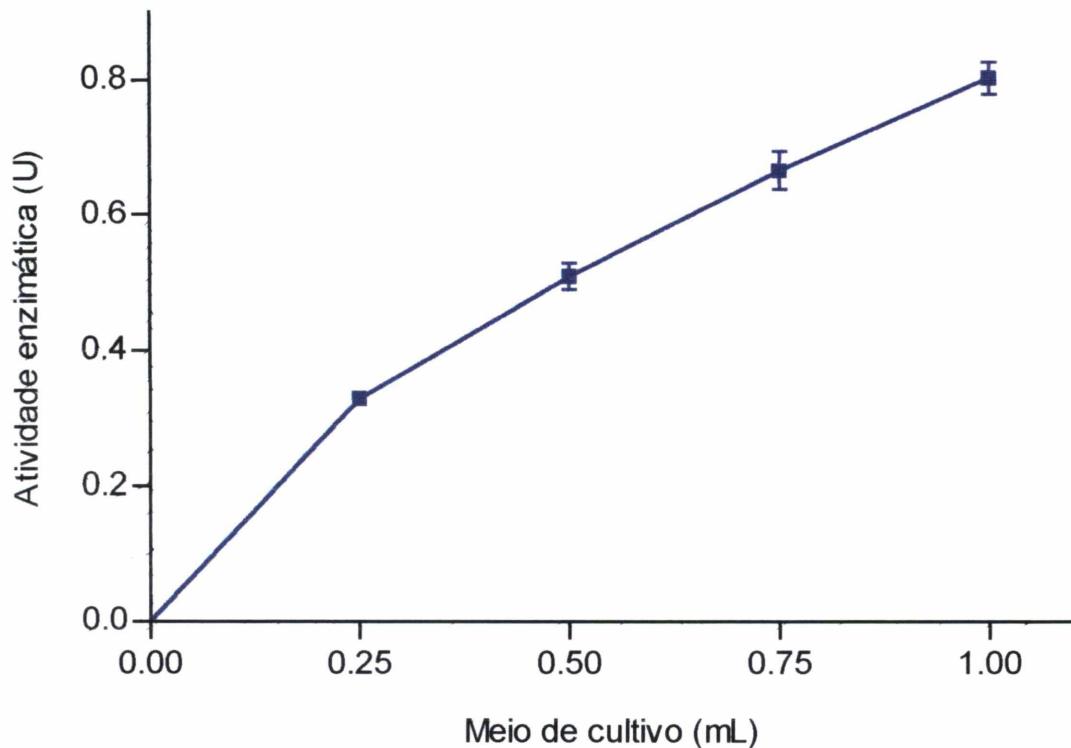


FIGURA 11: ATIVIDADE PROTEÁSICA EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DOS VOLUMES DE MEIO DE CULTIVO

Diferentes volumes do meio de cultivo dialisado foram ensaiados para a atividade enzimática em tampão acetado de sódio 0,1 M e pH 4,8 contendo 20 mg de azocaseína. O período de incubação foi de 1 hora à temperatura de 40° C sob agitação. Os demais procedimentos foram idênticos ao descrito no item 3.12.a.

O resultado representa a média do ensaio dosado em triplicata.

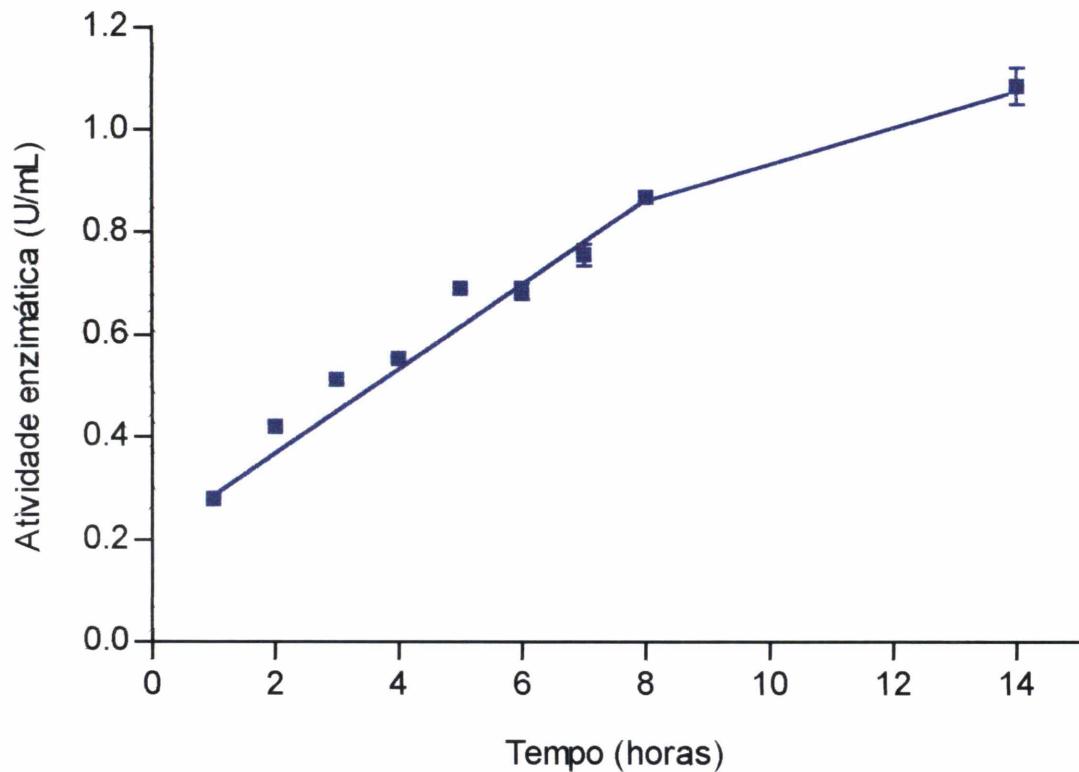


FIGURA 12: EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Um mililitro de meio de cultivo dialisado foram incubados em tempos diferentes com o substrato azocaseina. As atividades enzimáticas foram analisadas de 1 em 1 hora até 8 horas e no tempo de 14 horas com 5 mg de azocaseina, conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a. O resultado representa a média do ensaio dosado em triplicata.

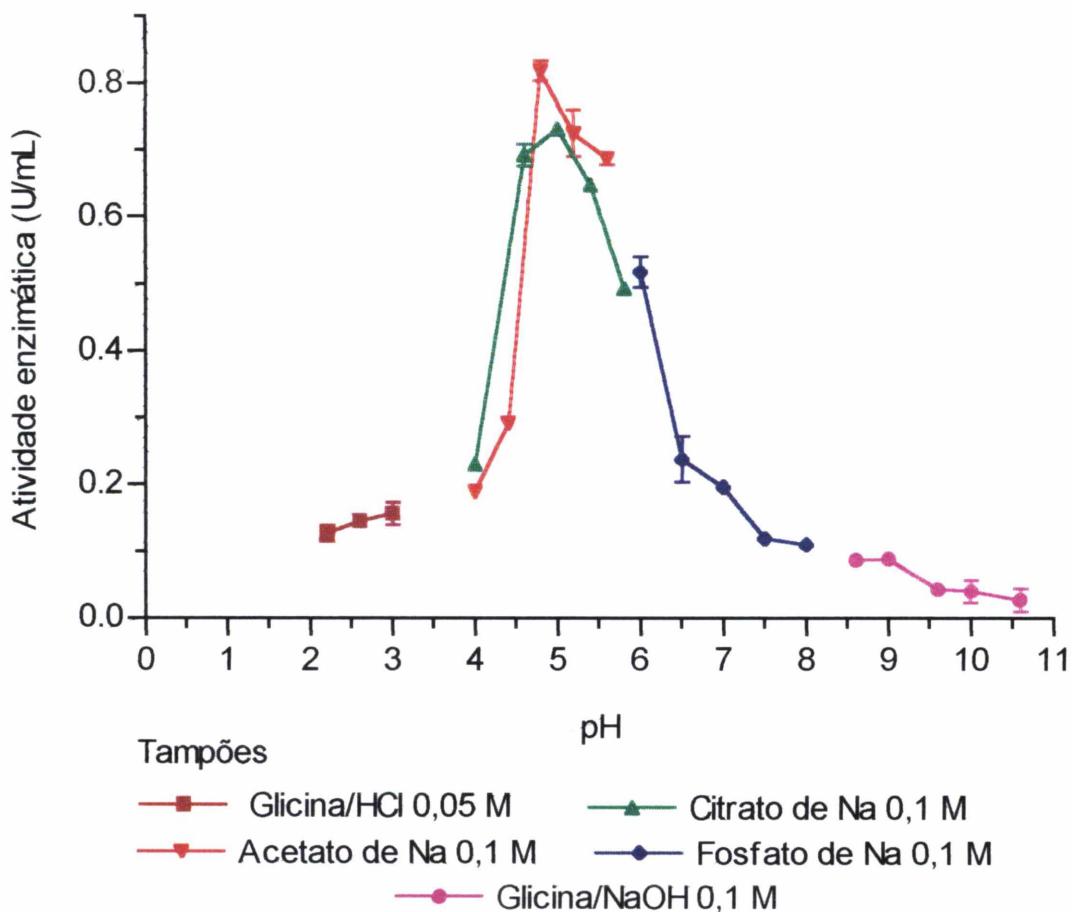


FIGURA 13: EFEITO DO pH SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA

Um mililitro do meio de cultivo dialisado (2,85 mg/mL de proteínas) foram incubados com: tampão acetato de sódio 0,1 M (pH 4,0 a 6,0); tampão citrato de sódio 0,05 M (pH 3,2 a 5,8); tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 6,0 a 8,0); tampão glicina/NaOH 0,1 M (pH 8,0 a 10,6); e tampão glicina/HCl (pH 2,2 a 3,2). Em seguida foram incubados com 20 mg de azocaseína durante 1 hora à temperatura de 40° C sob agitação. Os demais procedimentos foram os mesmos descritos no item 3.12.a.

O resultado representa a média do ensaio dosado em triplicata.

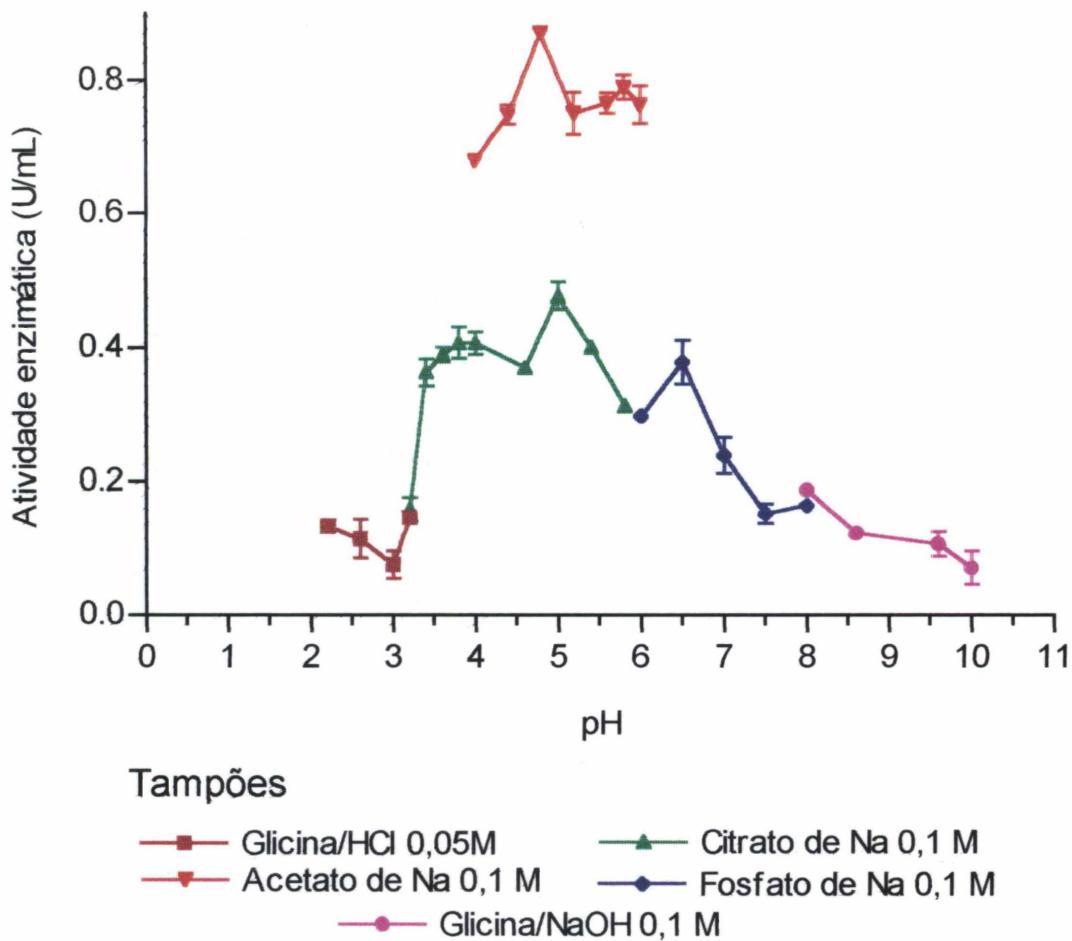


FIGURA 14: ESTABILIDADE AO pH

A um mL do meio de cultivo dialisado (2,85 mg/mL de proteínas) foram adicionados um mL de diferentes tampões nas concentrações indicadas, ajustando-se o pH das misturas entre pH 3,0 a 9,5 com NaOH ou HCl em potenciômetro. Foram incubados por 24 horas a 4° C nos diferentes pH. Após esse período os pH foram ajustados ao pH 4,8 para a medida da atividade enzimática conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

O resultado representa a média do ensaio dosado em triplicata.

#### 4.10 EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE E A ESTABILIDADE DA PROTEASE

Os dados da figura 15 mostram que a temperatura ótima para a atividade proteolítica extracelular do *Thelephora terrestris* foi de 40° C.

No ensaio para estabilidade térmica os dados da figura 16 mostram que a enzima perde cerca de 53% de sua atividade quando exposta por 10 minutos a 50° C, 75,5% a 60° C e no mesmo tempo 90% é inativada a 70° C.

#### 4.11 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DO SUBSTRATO PARA DETERMINAÇÃO DE Km

Para a caracterização da atividade proteolítica extracelular foi utilizado o meio de cultivo que tinha a maior atividade enzimática, ou seja, o meio contendo gelatina + glucose.

O dados da figura 17 mostram o efeito da concentração da azocaseína sobre a atividade proteolítica da *Thelephora terrestris*. Para este substrato o valor de Km aparente calculado foi de  $2,0 \pm 0,5$  mg/mL.

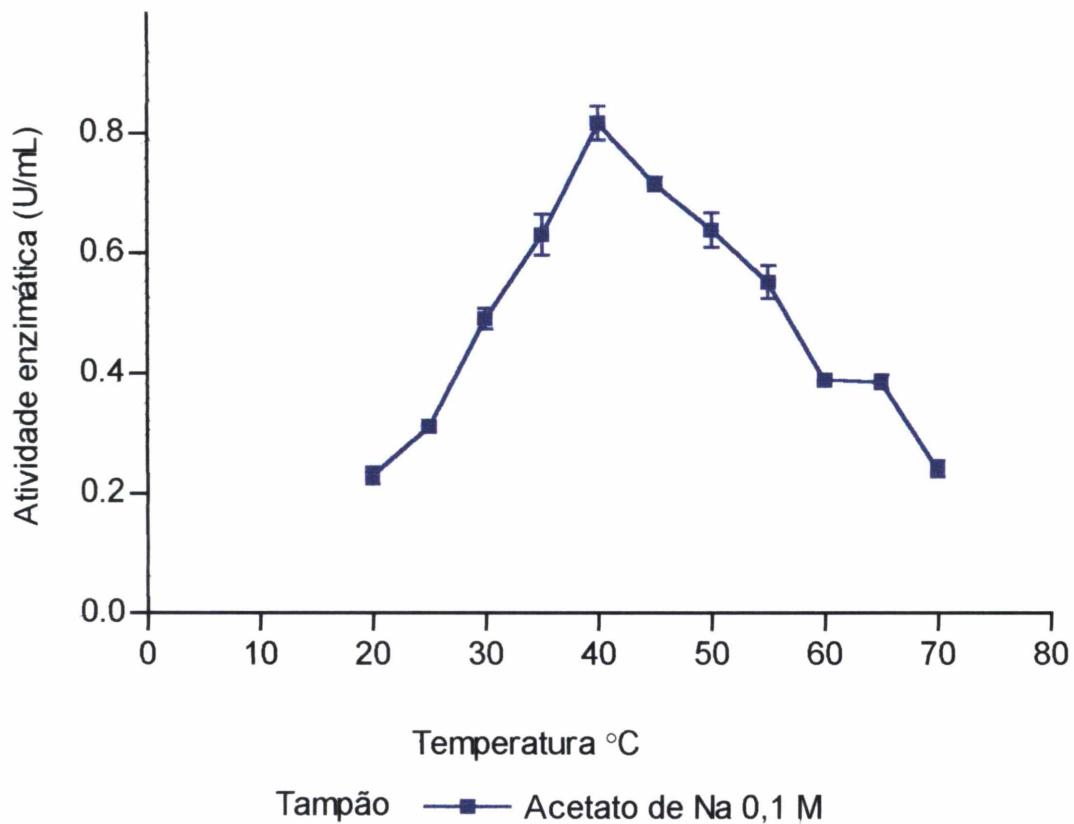


FIGURA 15: EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA

Um mL de meio de cultivo dialisado (2,85 mg/mL de proteínas) foi incubado com um mL de tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 e 20 mg do substrato azocaseína em diferentes temperaturas (de 20° C a 70° C) por 1 hora e determinada a atividade enzimática conforme descrito no item 3.12.a.

O resultado representa a média do ensaio em triplicata .

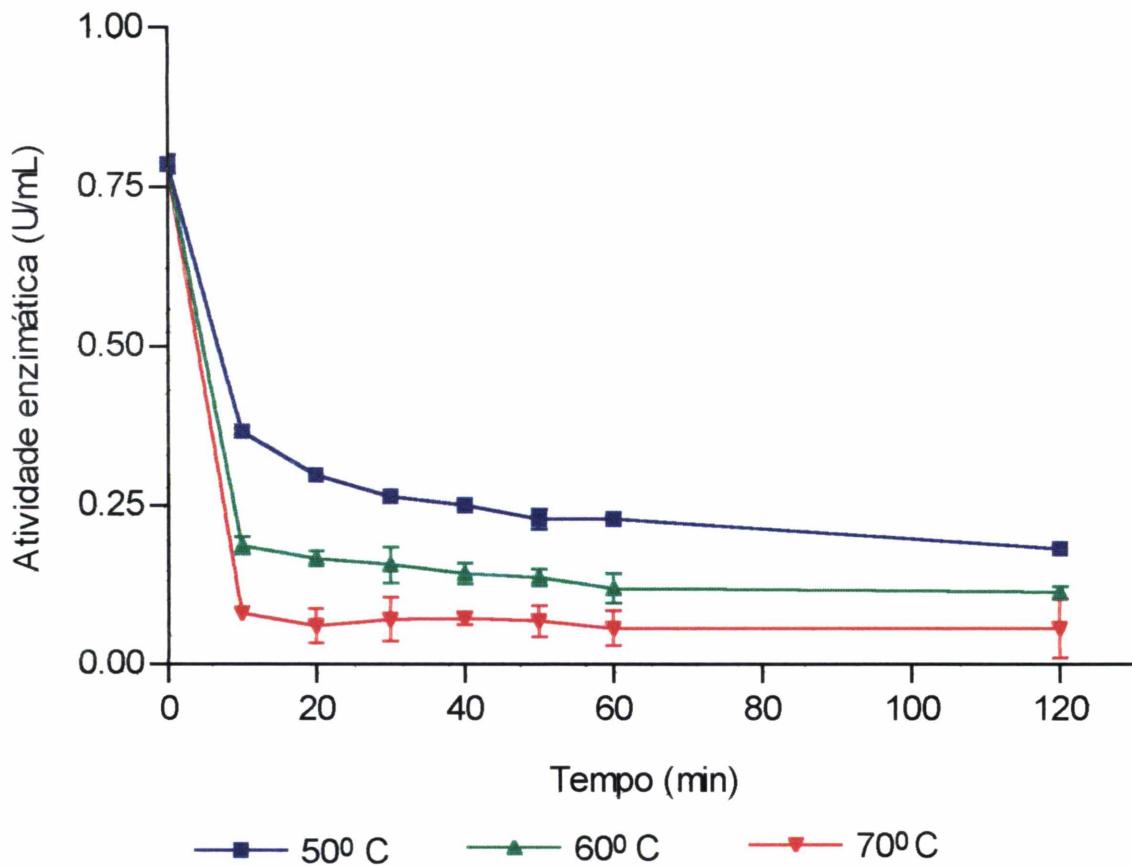


FIGURA 16: ESTABILIDADE TÉRMICA

Um mL do meio de cultivo (2,85 mg/mL de proteínas) foi incubado em diferentes temperaturas por diferentes tempos.

Após resfriados foram ensaiados conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

O Controle apresentava uma atividade de 0,7654 U/mL.

O resultado representa a média dos ensaios em triplicata conforme descrito em materiais e métodos 3.17.b.

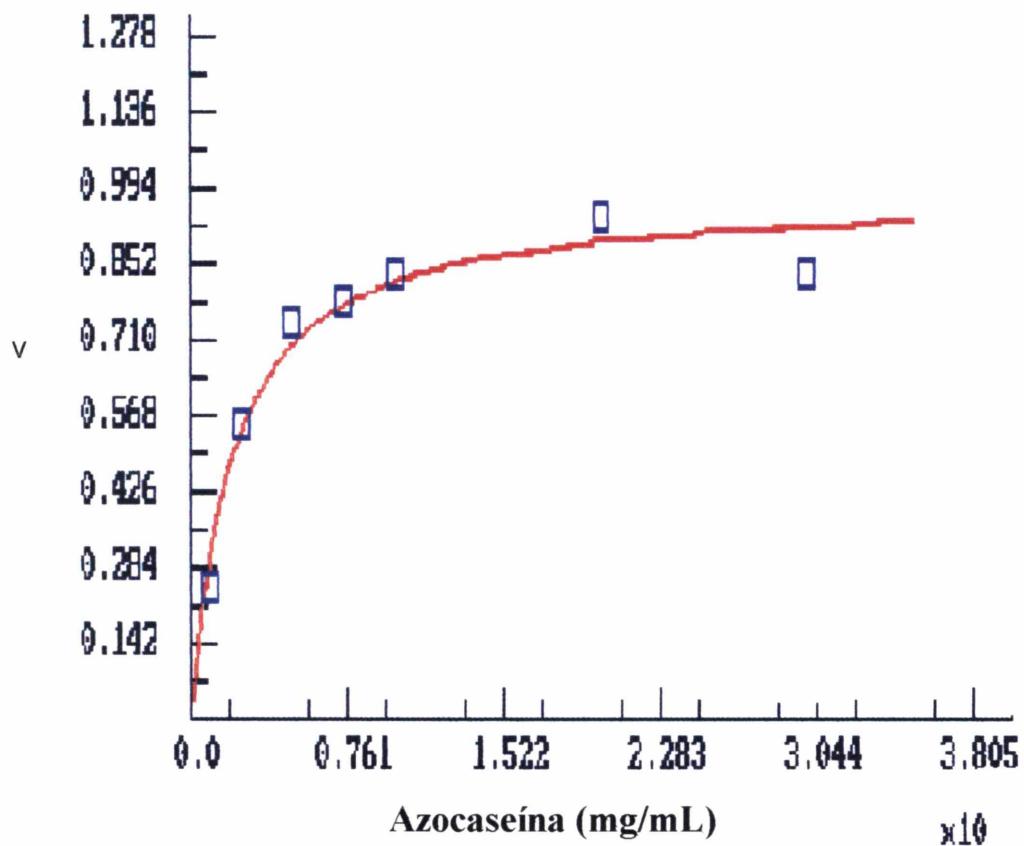


FIGURA 17: EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AZOCASEÍNA

$$K_m \text{ app} = 2,0 \pm 0,47 \text{ mg/mL}$$

Um mL do meio de cultivo dialisado contendo 0,95 unidades de enzima foi ensaiado com diferentes concentrações de azocaseína (1 a 30 mg) em tampão acetato de sódio 0,1 M pH 4,8 a 40° C e incubadas sob agitação em 1, 2, 3 e 4 horas conforme descrito em materiais e métodos 3.15.

Valor de v é a média de três ensaios em triplicata tomados na velocidade inicial.

v= unidades/ mL

#### 4.12 AGENTES INIBIDORES QUE AFETAM A ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Vários inibidores da atividade proteolítica foram usados para estabelecer a identidade da protease. Os dados das tabelas 7 mostram que o PMSF 4 mM (inibidor de serina protease) inibiu 21% da enzima; o EGTA 10 mM (quelante específico de  $\text{Ca}^{2+}$ ) inibiu cerca de 11%. O EDTA 10 mM (quelante de metais) inibiu em 72% a atividade enzimática. Quando se analisou o efeito de inibidores de grupo SH (tabela 8) se verificou que o iodoacetamida promoveu uma fraca inibição, em torno de 10%. O E-64 (inibidor específico de grupo tióis da família das papaínas) inibiu em torno de 22% com uma concentração de 0,25 mM. O pCMB (inibidor de grupos SH) a 5 mM inibiu em torno de 70%. A pepstatina (inibidor de proteases ácidas) a 1  $\mu\text{M}$  inibiu 45% da atividade enzimática.

#### 4.13 EFEITO DOS PROTETORES DO GRUPO SH SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Como o pCMB (tabela 8) provocou uma forte inibição da atividade, foi testado a reversão da inibição por protetores de grupos SH. Os dados da tabela 9 mostram que após 4 horas de incubação, com concentrações 10 vezes superiores, não ocorreu reversão da inibição por cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol e pCMB continuou inibindo a atividade enzimática. Quando o meio de cultivo foi tratado previamente com cisteína observa-se uma ativação da enzima até a concentração de 0,5 mM. Em concentração acima de 0,75 mM ocorreu a inibição da atividade enzimática (tabela 10).

TABELA 7: EFEITO DE INIBIDORES SOBRE A ATIVIDADE DA PROTEASE EXTRACELULAR EM *Thelephora terrestris*

Inibidor	Concentração	U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Inibição %
None		0,8609 ± 0,023	
PMSF <sup>a</sup>	4 mM	0,6863 ± 0,093	21
EDTA <sup>b</sup>	10 mM	0,2397 ± 0,497	72
EGTA <sup>c</sup>	10 mM	0,7678 ± 0,027	11
Pepstatina	1µM	0,4762 ± 0,032	45

<sup>a</sup> Fluoreto de fenil-metil-sulfonila

<sup>b</sup> Ácido etileno-diamino-tetracético

<sup>c</sup> Ácido etileno-glicol bis (βaminoetil eter) N', N'-tetra acético

Um mL do meio de cultivo dialisado foi pré-incubado com os inibidores por 1 hora e após esse tempo a atividade residual foi ensaiada conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

Os resultados representam a média dos ensaios dosados em triplicatas conforme descritos em materiais e métodos 3.18.

TABELA 8: EFEITO DE INIBIDORES DE GRUPOS SH SOBRE A ATIVIDADE PROTEÁSICA EM *Thelephora terrestris*

Inibidor	Concentração	U ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	Inibição %
None		0,8504 ± 0,023	
Iodoacetamida	5 mM	0,7130 ± 0,025	10
pCMB <sup>1</sup>	5 mM	0,2528 ± 0,015	70
E-64 <sup>2</sup>	0,25 mM	0,6583 ± 0,041	22

<sup>1</sup> p-cloromercúrio-benzoato

<sup>2</sup> butano-trans-epoxisuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)

O ensaio foi realizado como descrito na tabela 7.

TABELA 9: REVERSÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR PROTETORES DO GRUPO SH

Inibidor	Concentração	U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
None		0.9907 ± 0,101
pCMB	5 mM	0.5177 ± 0,081
pCMB + cisteína	50 mM	0.2392 ± 0,046
pCMB + $\beta$ -mercaptoetanol	50 mM	0.1087 ± 0,028

Um mL do meio de cultivo dialisado foi pré-incubado com os inibidores por 1 hora e após esse tempo foram adicionados cisteína e  $\beta$ -mercaptoetanol e mantidas por 4 horas antes dos ensaios.

As atividades residuais foram ensaiadas conforme descrito em materiais e métodos 3.12.a.

Os resultados representam a média de dois ensaio em triplicatas conforme descrito em materiais e métodos 3.19.

TABELA 10: EFEITO DA CISTEÍNA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Concentração de cisteína/HCl	U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>
None	0.8504 ± 0,023
0.10 mM	0.8271 ± 0,017
0.25 mM	0.9671 ± 0,012
0.50 mM	0.9278 ± 0,016
0.75 mM	0.8094 ± 0,045
1.00 mM	0.7106 ± 0,005

Um mL do meio de cultivo dialisado, foi incubado com cisteína/HCl por 15 minutos.

As condições de ensaio estão descrito em materiais e métodos 3.20.

Os resultados representam a média dos ensaios dosados em triplicata.

#### 4.14 EFEITO DOS CÁTIONS SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Na tabela 7 observa-se que o quelante de metais EDTA provocou uma inibição de 72%. Para confirmar a presença de uma metaloproteinase, foi estudado a reversão da inibição por íons metálicos (tabela 11). Após a inibição com 10 mM de EDTA por 1 hora, foram adicionados 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  e  $\text{MgSO}_4$ , 5 mM de  $\text{CoCl}_2$  e  $\text{ZnSO}_4$  e deixados por 4 horas em contato. Observa-se que a recuperação com o  $\text{Ca}^{2+}$  é de 29% e com os demais íons não se observou reversão da inibição.

Ensaios para verificar a ativação da enzima com adição de cálcio, cobalto, magnésio, sódio e manganês (tabela 12) mostra uma pequena ativação quando foram adicionados à mistura de reação na concentração de 0,1 mM.

#### 4.15 ANÁLISE DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM ELETROFORESE

Como os ensaios com inibidores não permitiram caracterizar a enzima, o meio de cultivo foi submetido a eletroforese em condições não desnaturante.

A execução da eletroforese nativa foi dificultada por vários fatores. A atividade proteásica encontrava-se agregada toda vez que o meio era concentrado. O fungo *Thelephora terrestris* pela sua característica de sazonalidade, exigiu maior tempo de cultivo para a secreção da enzima ( $\pm 7$  dias). Nesse tempo de cultivo, o fungo produziu um pigmento amarelo-marron, no qual a enzima ficava agregada. As várias tentativas para desagregar a enzima do pigmento utilizando  $\text{NaCl}$  1M, uréia 4M, e uréia 4M+ SDS 1mM foram infrutíferas. Com o uso de etilenoglicol na concentração final de 5% evitou-se a formação de agregados.

Por essa razão foi adicionado a todos os ensaios de eletroforese (Carmona et al., 1995).

A análise de protease secretada por *Thelephora terrestris*, cultivada em meio MMN mínimo, revelou a presença de três bandas de atividade proteolítica em gel com gelatina (figura 18), demonstrando que a enzima secretada por *Thelephora terrestris* é um complexo proteolítico. Na amostra eluída em CM-celulose há uma banda a menos e no ensaio com inibidores com a fração eluída de CM-celulose observa que não há inibição por EDTA. A tentativa de determinação da massa molecular das frações alvos ficou prejudicada porque a migração da enzima em gel com substratos poliméricos pode ser retardada pela interação com substratos copolimerizados, tornando difícil a determinação de massas moleculares por comparação com marcadores protéicos (Rauscher et al., 1995).

TABELA 11: REVERSÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA POR CÁTIONS

	Concentração	U ml <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> **
None		0,9907 ± 0,101
EDTA	10 mM	0,4388 ± 0,032
+ Ca <sup>++</sup>	100 mM	0,7307 ± 0,007
+ Mg <sup>++</sup>	100 mM	0,4283 ± 0,025
+ Na <sup>+</sup>	100 mM	0,2550 ± 0,051
+ Zn <sup>++</sup>	100 mM	0,3622 ± 0,095

Um mL do meio de cultivo dialisado foi incubado por 1 hora com EDTA.

Após esse tempo foram adicionados Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, Na<sup>+</sup> e Zn<sup>++</sup> para atingir as concentrações finais indicadas.

As condições do ensaio estão descrito em materiais e métodos 3.19.

Os resultados representam a média do ensaio dosado em triplicata.

TABELA 12: ATIVAÇÃO DA ENZIMA EXTRACELULAR EM *Thelephora terrestris* COM DIFERENTES ÍONS

	Atividade proteolítica (U/mL)	Ativação (%)
Controle	1,012 ± 0,092	
Ca <sup>2+</sup> (CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O) 0,1 mM	1,012 ± 0,025	0
Zn <sup>2+</sup> (ZnSO <sub>4</sub> ) 0,1 mM	1,005 ± 0,012	0
Mg <sup>2+</sup> (MgSO <sub>4</sub> ) 0,1 mM	1,026 ± 0,033	1,33
Mn <sup>2+</sup> (MnSO <sub>4</sub> ) 0,1 mM	1,022 ± 0,073	0,93
Co <sup>2+</sup> (CoCl <sub>2</sub> ) 0,1 mM	1,067 ± 0,135	5,38

As condições de ensaio estão descritas em materiais e métodos 3.21.

Os resultados representam a média de dois ensaios dosados em triplicata.

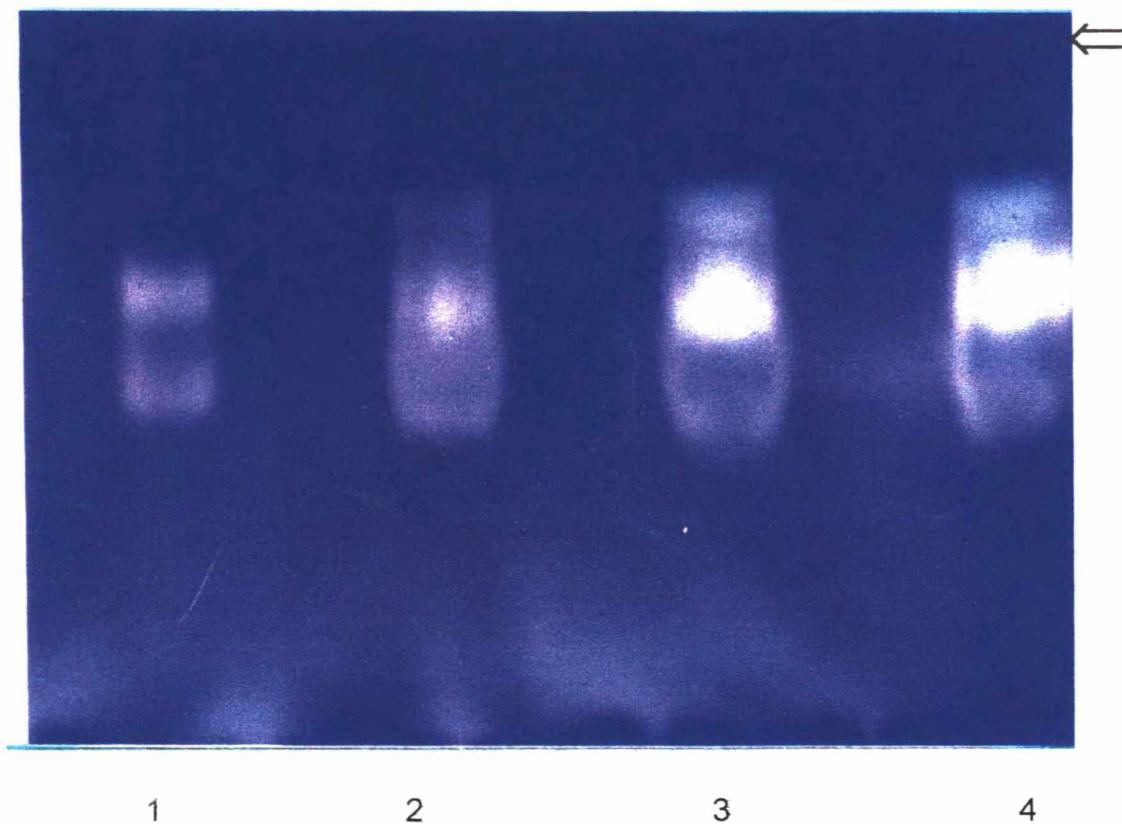


FIGURA 18: ATIVIDADE PROTEOLÍTICA EM ELETROFORESE

Eletroforese em gel de poliacrilamida nativa 7,5% com 0,5% de gelatina como descrito em materiais e métodos 3.22.

A seta indica a origem da migração.

- 1 Amostra eluída da coluna de CM-celulose - 18 µg de proteínas;
- 2 Meio de cultivo concentrado - 60 µg de proteínas;
- 3 Meio de cultivo concentrado - 200 µg de proteínas;
- 4 Meio de cultivo concentrado - 400 µg de proteínas;

#### 4.16 PERFIL PROTÉICO DO FILTRADO DE CM-CELULOSE EM GEL DE POLIACRILAMIDA - (SDS-PAGE)

Amostra concentradas em Amicon PM 30 foram cromatografadas na coluna de CM-celulose para a retirada do pigmento que interferia no experimento de eletroforese. A atividade enzimática foi eluída no tampão acetato de sódio 0,2 M e pH 4,8. As frações de maior teor protéico foram concentradas e analisadas por eletroforese (figura 19) e revelaram a presença de no mínimo 7 bandas protéicas.

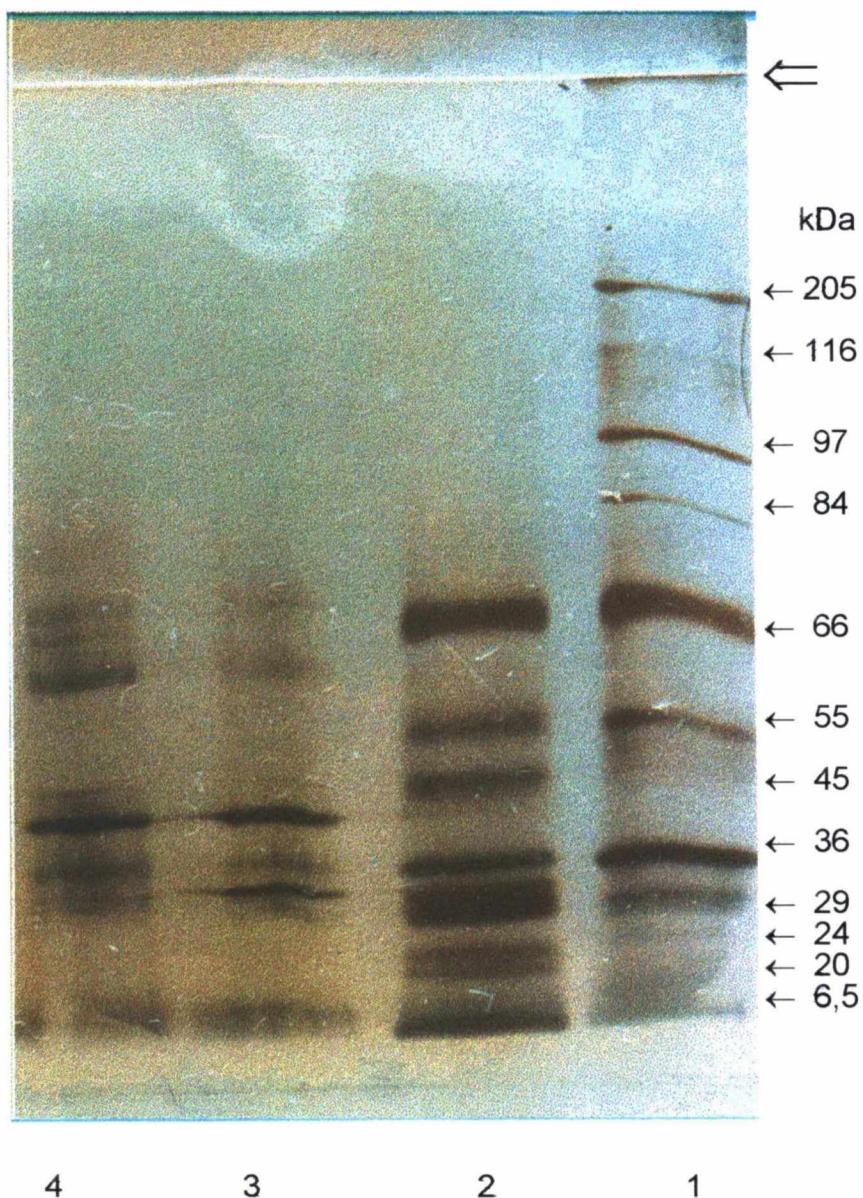


FIGURA 19: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Eletroforese em gel gradiente de 4 - 15% corrida em aparelho Phastsystem da Pharmacia conforme descrito em materiais e métodos 3.22.

A seta indica a origem da migração.

- 1 Padrão de alta massa molecular;
- 2 Padrão de baixa massa molecular;
- 3 Amostra eluída da coluna de CM-celulose - 2 µg de proteínas;
- 4 Meio de cultivo concentrado - 2 µg de proteínas;

## 5 DISCUSSÃO

Os níveis da atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris* variam com o estado fisiológico do cultivo. A agitação do meio de cultivo é essencial para a produção da enzima proteolítica pelo fungo ectomicorrízico *Thelephora terrestris*, visto que em cultivos sem agitação a produção da enzima foi reduzida. Semelhante fenômeno foi observado em cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* onde o oxigênio foi suplementado no decorrer do cultivo. A oxigenação aumentou o nível de secreção de ambas as enzimas proteolíticas produzidas por este fungo (Dosoretz et al., 1990).

Não se observou diferença no crescimento do fungo quando se variou a concentração de glucose, mantendo-se constante concentração de nitrogênio. O mesmo ocorreu quando se variou a concentração de nitrogênio mantendo-se a concentração de glucose sem alteração. Quando se suplementou o meio MMN com gelatina como fonte de nitrogênio e glucose como fonte de carbono, a massa micelial aumentou 6,6 vezes em relação ao meio MMN e glucose.

Quando a gelatina foi adicionada ao meio como indutor, os níveis de atividade proteolítica por massa micelial aumentaram em uma vez. A adição de fosfato de amônio ao meio induzido não alterou os níveis de enzima. Já a adição de glucose provocou uma diminuição nos níveis de atividade proteolítica por massa micelial, sugerindo que a glucose estaria reprimindo a síntese de enzima. Resultados similares foram obtidos por Bidochka e Khachatourians (1988), onde

estes autores sugerem uma regulação parcial por glucose da enzima secretada por *B. bassiana*.

No crescimento sem indução, com aumento da concentração de fosfato de amônio de 3,7 mM a 11,2 mM e mantendo-se constante a concentração de 27,75 mM de glucose, a atividade enzimática diminuiu em 52% em 72 horas de crescimento. Quando se variou a concentração de sulfato de magnésio não se observou variação significativa nos teores de enzima.

O conjunto de dados sugere que a expressão da protease possa ser regulada por catabólitos da glucose e do nitrogênio, à semelhança do que ocorre com outras enzimas fúngicas (Bidochka e khachatourians, 1988; Ahman et al., 1996; Cohen, 1972, 1977; Hanson e Marzluf, 1975) e diferente da expressão da proteinase de *Hebeloma* que é sujeita apenas a repressão por nitrogênio (Zhu et al., 1994).

A atividade proteolítica de *Thelephora terrestris* foi maior em tampão acetato de sódio com pH 4,8 para a proteólise da azocaseína. A atividade da enzima foi estável na faixa de pH 4,6 a 5,6 com o tampão acetato de sódio 100 mM. Esse comportamento foi semelhante aos resultados observados por Wadekar et al (1995) para a enzima proteolítica dos fungos *Serpula lacryman* e *Coriolus versicolor* e por Usha e Singh (1996) para a enzima proteolítica de semente de *Psophocarpus tetragonolobus*, cujas enzimas foram classificadas como proteinases ácidas.

Na caracterização da protease de *Thelephora terrestris*, com o substrato azocaseína, a temperatura ótima para a atividade proteásica foi de 40° C. Em temperaturas acima de 45° C a atividade diminuía. Quanto a estabilidade térmica da atividade enzimática, observou-se uma perda em torno de 53% nos primeiros 10 minutos a 50° C. Markaryan et al (1994) e Bidochka e Khachatourians (1987)

encontraram resultados similares com as enzimas secretadas pelo fungo por eles pesquisados.

O perfil de inibição da atividade proteolítica de *Thelephora terrestris* mostrou que essa atividade não era inibida por iodoacetamida e por E-64. Estes dados sugerem que a cisteína não se encontra no sítio ativo da enzima e que essa atividade não é de uma verdadeira cisteína protease por não ser inibida por E-64, o qual segundo Hasnain et al. (1991) é um inibidor específico desse tipo de proteinases. A atividade foi inibida em 70% por pCMB. Quando se procurou recuperar a inibição usando-se cisteína/HCl e  $\beta$ -mercaptoetanol não se observou a reativação da enzima. Este resultados sugerem que as pontes dissulfeto podem estar envolvidas no processo de estabilização da enzima, como foi observado por Krarup et al. (1994).

O comportamento da atividade proteolítica de *Thelephora terrestris* frente a inibidores é semelhante à enzima “humicolin”, produzida pelo fungo *Thermomyces lanuginosus*, o qual é inibida por produtos que reagem com os grupos tióis livres, como o  $\text{Hg}^{2+}$ , pCMB ou pCMPSA. A enzima “humicolin” é também inibida por inibidor de serina protease PMSF e não por E-64, um inibidor específico de verdadeiras cisteínas proteases (Hasnain et al. 1991).

A enzima proteolítica do fungo *Thelephora terrestris* também foi inibida em cerca de 72% por EDTA e em 11% por EGTA. O cálcio recuperou 29,46% da atividade proteolítica, quando a enzima foi inibida por EDTA. Os demais íons testados não recuperaram a atividade. Ensaios com íon cálcio não ativaram a enzima, no entanto a enzima foi ativada em 5,38% pelo cobalto, 1,33% pelo magnésio e 0,93% pelo manganês. Comportamento semelhante foi observado por Usha e Singh, (1996) trabalhando com a WbAP protease.

A atividade enzimática do fungo *Thelephora terrestris* foi inibida em torno de 45% pela pepstatina, um inibidor de protease ácida, sugerindo a importância de ácido aspártico para a atividade enzimática.

A atividade proteolítica de *Thelephora terrestris* foi inibida em 21% por PMSF.

Os estudos com inibidores mostram a possibilidade de haver mais de uma atividade proteolítica no meio de cultura de *Thelephora terrestris*, embora se tenha descrito em *Paracoccidioides brasiliensis* apenas uma proteinase que é tiol-serina protease (Carmona et al, 1995).

O perfil eletroforético mostra que há mais de uma atividade proteolítica extracelular em cultivos de *Thelephora terrestris*, o que pode explicar a resposta observada frente a vários inibidores.

Os resultados deste estudo sugerem que a produção de atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris* seja regulada por indução e por repressão por nitrogênio e glucose. Mecanismos semelhantes ocorrem com os fungos *B. bassiana* (Bidochka e Khachatourians, 1988), *Arthrobotrys oligospora* (Ahman et al., 1996), *Aspergillus* e *Neurospora* (Cohen, 1972, 1975; Aboot e Marzluf, 1984).

Os estudos de fisiologia envolveram o complexo proteolítico como um todo, significando que pode haver variação na expressão das diferentes atividades em função das condições fisiológicas.

Com base no presente estudo de caracterização é impossível diferenciar as proteases no complexo proteolítico. Para entender a natureza e propriedades das proteases do complexo proteolítico extracelular de *Thelephora terrestris*, é necessário isolar, purificar e caracterizar estas enzimas separadamente. O mecanismo de regulação da síntese e da secreção exigirá estudos mais aprofundados a nível genético e molecular.

## 6 CONCLUSÕES

- a) A aeração do meio de cultivo é essencial para produção do sistema proteolítico de *Thelephora terrestris*.
- b) A atividade proteolítica extracelular apresenta um pH ótimo de 4,8 a uma temperatura ótima de 40° C.
- c) Para o substrato azocaseína a atividade proteolítica apresenta o valor de  $Km_{(app)}$  de  $2,0 \pm 0,5$  mg/mL.
- d) A atividade proteolítica é inibida por p-CMB 5 mM (70,28%), por EDTA 10 mM (72%), por pepstatina 1 $\mu$ M (45 %), por E-64 0,25 mM (22%) e por PMSF 4 mM (21%).
- e) O perfil eletroforético da atividade proteolítica extracelular de *Thelephora terrestris* em gel de poliacrilamida contendo gelatina revela a presença de três bandas atividade.
- f) Os níveis da atividade proteolítica aumentaram pela adição de gelatina (1%) ao meio

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, R.J.; MARZLUF, G.A. Major extracellular protease of *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 159, p. 505-510, 1984.
- AHMAN, J.; EK, B.; RASK, L.; TUNLID, A. Sequence analysis and regulation of a gene encoding a cuticle-degrading serine protease from the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Microbiology*, Reading, v. 142, p. 1605-1616, 1996.
- BAI, Y.; HAYASHI, R. Properties of the single sulfhydryl group of carboxypeptidase Y. Effects of alkyl and aromatic mercurials on activities toward various synthetic substrates. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 254, n. 7, p. 8473-5479, 1979.
- BIDOCHEKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and properties of an extracellular protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 53, n. 7, p. 1679-1684, 1987.
- BIDOCHEKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beaveria bassiana*. *Exp. Mycol.* Orlando, v. 12, p. 161-168, 1988.

BOTTON, B.; EL BADAQUI, K.; MARTIN F. Induction of extracellular proteases in the ascomycete *Cenococcum geophilum*. In: Gianinazzi-Person, V; Gianinazzi, S. (eds) *Mycorrhizae: Physiology and genetics aspects of mycorrhizae*, INRA-Paris, 1985. p. 403-406.

CARMONA, A.K.; PUCCIA, R; OLIVEIRA, M.C.F.; RODRIGUES, E.G.; JULIANO, L. Characterização of na exocellular serine-thiol proteinase activity in *Paracoccidioides brasiliensis*. *Biochem. J.*, London, v. 309, p. 209-314, 1995.

CHANAY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagentes for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.*, Washington, v. 8, n.2, p. 130-132, 1962.

CLINE, M.L.; FRANCE, R.C.; REIDE, P.C.P. Intraespecific and interspecific growth variation of ectomycorrhizal fungi at different temperatures. *Can. J. Botan.*, Ottawa, v. 65, p. 869-875, 1987.

COHEN, B.L. Ammonium repression of extracellular protease in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.*, Reading, v. 71, p. 293-299, 1972.

COHEN, B.L.; MORRIS, J.E.; DRUCKER, H. Regulation of two extracellular proteases of *Neurospora crassa* by induction and carbon-nitrogen and sulfur-mabolite repression. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v. 169, p. 324-330, 1975.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterisation of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarrhizium anisopliae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, Amsterdam, v. 113, p. 189-196, 1993.

DATTA, A., Purification and characterization of a novel protease from solid substrate cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 267, n. 2, p. 728-732, 1992.

DAHLQVIST, A. Determination of maltose and iso maltose activities with a glucose oxidase reagent. *Biochem. J.*, London, v. 80, p. 547- 551, 1961.

DEAN, D.D.; DOMNS, A.J. The extracellular proteolytic enzymes of the mosquito-parasitizing fungus *Lagenidium giganteum*. *Exp. Mycol.*, Orlando, v. 7, p. 31-39, 1983.

DE VICENTE, J.I.; DE ARRIAGA, D.; DEL VALLE, P.; SOLER, J. Purification and characterization of na extracellular aspartate protease from *Phycomyces blakesleeanus*. *Fungal Gen. Biol.*, Orlando, v. 20, p. 115-124, 1996.

DiSANTO, M.E.; LI, Q.; LOGAN, D.A. Purification and characterization of a developmentally regulated carboxypeptidase from *Mucor racemosus*. *J. Bacteriol.*, Washington, v. 174, n. 2, p. 447-455, 1992.

DOSORETZ, C.G.; CHEN, H; GRETHLEIN, H.E. Effect of environmental conditions on extracellular protease activity in lignolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Wasington, v. 56, n. 2, p. 395-400, 1990.

FARLEY, P.C.; IKASARI, L. Regulation of the secretion of *Rhizopus oligosporus* extracellular carboxil proteinase. *J. Gen. Microbiol.*, Reading , v. 138, p. 2539-2544, 1992.

FISCHER, E-P.; THOMSON, K.S. Serine proteinase and their inhibitor in *Phycomyces blakesleeanus*. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 254, p. 50-56, 1979.

GRIPON, J.C.; AUBERGER, B.; LENOIR, J. Metalloproteases from *Penicillium caseicolum* and *P. roquerforti*: comparison of specificity and chemical characterization. *Int. J. Biochem.*, Exeter, v. 12, p. 451-455, 1980.

GRONINGER, H.S. JR; EKLUND, M.W. Characteristics of a proteinase of a *Trichosporon* species isolated from dungeness crab meat. *Appl. Microbiol.*, Washington, v. 14, n. 1, p. 110-114, 1966.

HACSKAYLO, E. Researching the potential of forest tree mycorrhizae. *Plant and Soil*, Dordrecht, v. 71, p. 1-8, 1983.

HANSON, M.A.; MARZLUF, A. Control of the synthesis of a single enzyme by multiple regulatory circuits in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Allahabad, v. 72, p. 1240-1244, 1975.

HASNAIN, S.; ADELI, K.; STORER, A. Purification and characterization of na extracellular thiol-containing serine proteinase from *Thermomyces lanuginosus*. *Biochem. Cell Biol.* Ottawa, v. 70, p. 117-122, 1992

HELLMICH, S.; SCHAUZ, K. Production of Extracellular Alkaline and Neutral Proteases of *Ustilago maydis*. *Exp. Mycol.*, Orlando, v. 12, p. 223-232, 1988.

HUTCHISON, I. J. Studies on the systematics of ectomycorrhizal fungi in axenic culture. II. The enzymatic degradation of selected carbon and nitrogen compounds. *Can. J. Botan.*, Ottawa, v. 68, p. 1522-1530, 1990.

ITO, K. ; YAMASAKI, M. Specificity of acid proteinase a from *Aspergillus niger* var. macrosporus towards B-chain of performic acid oxidized bovine insulin. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 429, p. 912-924, 1976.

KHAN, M.T.; ROUFOGALIS, B.D. Understanding the role of proteinases through a ubiquitous enzyme complex, the multicatalytic proteinase (MCP). *Biochem. Edu.*, Oxford, v. 22, n. 3, p. 114-120, 1994

KLAPPER, B.F.; JAMESON, D.M.; MAYER, R.M.. Factor affecting the synthesis and release of the extracellular protease of *Aspergillus oryzae* NRRL 2160. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 304, p. 513-519, 1973.

KOVALEVA, G.G.; SHIMANSKAYA, M.P.; STEPANOV, V.M. The site of diazoacetyl inhibitor attachment to acid proteinase of *Aspergillus awamori*- AN Analog of penicillopepsin and pepsin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v. 49, n. 4, p. 1075-1081, 1972

KRARUP, T.; OLSON, L.W.; HANSEN, H.P.H. Some characteristics of extracellular proteases produced by members of the Chytridiales and the Spizellomycetales (Chytridiomycetes). *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, v. 40, p. 106-112, 1994.

- KUECK, C. Shake-flask culture of *Laccaria laccata*, na ectomycorrhizal basidiomycete. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlim, v. 45, p. 319-326, 1996.
- KUNDU, A.K.; MANNA, S. Purification and characterization of extracellular proteinases of *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol.*, Washington, v. 30, n. 4, p. 507-513, 1975.
- LILLY, W.W.; HIGGINS, S.M.; WALLWEBER, G.J. Eletrophoretic detection of multiple proteases from *Schizophyllum commune*. *Mycologia*, Bronx, v 82, p. 505-508, 1990.
- LOWRY, O.R.; ROSEBROUGH, N..J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. . Protein measurement with thr Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARTIN, F.M., HILBERT, J.L. . Morphological, biochemical and molecular changes during ectomycorrhiza development. *Experientia*, Basil, v. 47, p. 321-331, 1991.
- MARKARYAN, A.; MOROZOVA, I.; YU, H. ; KOLATTUKUDY, P. E. Purification and characterization of na elastinolytic matalloprotease from *Aspergillus fumigatus* and immunoelectron microscopic evidence of secretion of this enzyme by the fungus invading the murine lung. *Infect. Immun.*, Washington, v. 62, n. 6, p. 2149-2157, 1994.
- MARX, D.H; BRYAN, W.C.; DAVEY, C.B. Influence of temperature on asseptic synthesis of ectomycorrhizae by *Thelephora terrestris* and *Pisolithus tinctorius* on Loblally pine. *Forest Sci.*, Bethesda, v. 16, n. 4, p. 424-431, 1970.

- MARX, D.H; KENNEY, D.S. Production of ectomycorrhizal fungus inoculum. *Methods and principles of Mycorrhizal research*. p. 31-146. Ed., N. C. Schenck. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota , 1982.
- MARZLUF, G.A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 45, n. 3, p. 437-461, 1981.
- MELHUISH, J.H.; HACSKAYLO, E. Fatty acid content of *Pisolithus tinctorius* in response to changing ratio of nitrogen and carbon sources. *Mycologia*, Bronx, v. 72, p. 1041-1044, 1980.
- MESTER, T.; PEÑA, M.; FIELD, A. Nutrient regulation of extracellular peroxidases in the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Berlin, v. 44, p. 778-784, 1996.
- MEYER, F. H. Physiology of mycorrhiza. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, v. 25, p. 567-586, 1974.
- MIKES,O.; TURKOVÁ, J.; TOAN, N.B.; SORM, F. Serine-containing active center of alkaline proteinase of *Aspergillus flavus*. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, v. 178, p. 112-117, 1969.
- MOLINA, R.; PALMER, J.G. Isolation, maintenance, and pure culture manipulation of ectomycorrhizal fungi. In: *Methods and principles of Mycorrhizal research*. Ed., N. C. Schenck. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 1982. p. 115-129

NAKADAI, T.; NASUNO, S.; IGUCHI, N. Purification and properties of neutral proteinase I from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 37, n.12, p. 2695-2701, 1973.

NAKADAI,T.; NASUNO, S.; IGUCHI, N. Purification and properties of neutral proteinase II from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 37, n. 12, p. 2703-2708, 1973.

NORTH, M.J. Comparative biochemistry of the proteinases of eucaryotic micro organisms . *Microbiol. Rev.*, Washington, v. 46, p. 308-340, 1982.

ODA, K.; TERASHITA, M.K.; MURAO, S. Occurrence of *Streptomyces* pepsin inhibitor-insensitive carboxyl proteinase in basidiomycetes. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 45, n. 10, p. 2339-2340, 1981.

PLASSARD,C.; MARTIN, F.; MOUSAIN, D. ET SALSAC, L. Physiology of nitrogen assimilation by mycorrhiza. In Gianinazzi-Person, V, Gianinazzi, S. (eds) *Mycorrhizae: Physiology and genetics aspects of mycorrhizae* INRA-Paris, p. 111-120, 1985

PRADELA, J.G.; ZUCCOLO, M.; LOPES, S.A.R.; OLIVEIRA, M. S. *Pisolithus tinctorius* vegetative mycelia production: Effects of nitrogen sources and cultivation in stirred tank fermenter. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, v. 22, n. 1, p .7-11, 1990.

RAUSCHER, M.; MENDGEN, K.; DEISING, H. Extracellular proteases of the rust fungus *Uromyces viciae-fabae*. *Exp. Mycol.*, Orlando, v. 19, p. 26-34, 1995.

RIPON, J.W.; VARADI, D. P. The elastases of pathogenic fungi and actinomycetes. *J. Invest. Dermatol.*, New York, v. 50, p. 54-58, 1968.

SEKINE, H. Neutral proteinases I and II of *Aspergillus sojae* : some physicochemical properties and amino acid composition. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 37, n. 8, p. 1945-1952, 1973.

SINGH, A.; GHOSH, V.K.; GHOSH, P. Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Lett. Appl. Microbiol.*, Oxford, v. 18, p. 177-180, 1994.

SMITH, R.A. Nutritional study of *Pisolithus tinctorius*. *Mycologia*, Bronx, v. 74, n. 1, p. 54-58, 1982.

THOMPSON, G.W.; MEDVE, R.J. Effects of aluminum and mansanase on the growth of ectomycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 48, n. 3, p. 556-560, 1984.

TOSH, J.E.; SENIOR, E.; SMITH, J.E.; WATSON-CRAIK, I.A. Ectomycorrhizal seedling response to selected components of landfill leachate. *Mycol. Res.*, Cambridge, v. 97, n. 2, p. 129-135, 1993.

TSUSHIMA, H.; MINE, H.; KAWAKAMI, Y.; HYODOH, F.; UEKI, A. *Candida albicans* aspartic proteinase cleaves and inactivates human epidermal cysteine proteinase inhibitor, cyastatin A. *Microbiology*, Reading, v. 140, p. 167-171, 1994.

TSUJITA, Y.; ENDO, A. Intracellular localization of two molecular forms of membrane acid protease in *Aspergillus oryzae*. *J. Biochem.*, Tokyo, v. 88, n. 1, p. 113-120, 1980.

USHA, R.; SINGH, M. Protease of germinating winged-bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) seeds: purification and characterization of na acidic protease. *Biochem. J.*, London, v. 313, p. 423-429, 1996.

WADEKAR, R. V.; NORTH, M. J.; WATKINSON, S. C. Proteolytic activities in two wood-decaying basidiomycete fungi, *Sepula lacrymans* and *Coriolus versicolor*. *Microbiology*, Reading, v. 141, p. 1575-1583, 1995.

WOLF, D.H. Proteinase action *in vitro* versus proteinase function *in vivo*: mutants shed light on intracellular proteolysis in yeast. *Trends Biochem. Sci.*, Cambridge, v. 7, p. 35-37, 1982.

ZHU, H.; DANCIK, B.P.; HIGGINBOTHAM, K. O Regulation of extracellular proteinase production in na ectomycorrhizal fungus *Hebeloma crustuliniforme*. *Mycologia*, Bronx, v. 86, n. 2, p. 227-234, 1994.