



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

Rafael Amadeu Barreto

**Produção e caracterização bioquímica funcional de peptidases do fungo
termofílico *Myceliophthora heterothallica***

São José do Rio Preto – SP

2024

Rafael Amadeu Barreto

**Produção e caracterização bioquímica funcional de peptidases do fungo
temofílico *Myceliophthora heterothallica***

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes

São José do Rio Preto – SP

2024

B273p

Barreto, Rafael Amadeu

Produção e caracterização bioquímica funcional de peptidases do fungo *Myceliophthora heterothallica* / Rafael Amadeu Barreto.
– São José do Rio Preto, 2024
52 p., 13 il., 6 tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Ronivaldo Rodrigues da Silva
Coorientadora: Eleni Gomes

1. Microbiologia. 2. Bioquímica. 3. Enzimas. 4. Fungos. 5. Proteases.

Rafael Amadeu Barreto

Produção e caracterização bioquímica funcional de peptidases do fungo
Myceliophthora heterothallica

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

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ronivaldo Rodrigues da Silva
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Eduardo da Silva Martins
UEMG – Universidade do Estado de Minas Gerais

Prof^a. Dra. Elisângela de Souza Miranda Muynarsk
UFMS – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

São José do Rio Preto - SP
28 de fevereiro de 2024

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me guiou e me deu forças até nos dias mais difíceis.

Ao meu orientador, Ronivaldo, que é o pesquisador mais admirável que tive a oportunidade de conhecer e a quem também sou grato pela oportunidade de poder trabalhar e aprender tanto com sua orientação neste trabalho.

Aos Profs. Drs. Eleni Gomes, Maurício Boscolo e Roberto da Silva pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa e usufruir da infraestrutura do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada.

Ao IBILCE, pela infraestrutura cedida para a realização de todo o nosso trabalho.

Aos meus pais, Josiane e Alessandro, que sempre confiaram e me apoiaram em minhas escolhas, aconselhando nos momentos necessários e incentivando nos momentos mais turbulentos.

Aos meus avós, Sidnei e Laura, por sempre incentivarem e oferecerem todo o suporte necessário para seguir com meus estudos desde o início da graduação.

À minha irmã, Camila, que se fez presente em todos os momentos, do início ao fim do meu mestrado, sempre oferecendo todo o carinho e confortando quando as coisas davam errado no dia-a-dia no laboratório.

À minha companheira, Hana, que me impulsiona e apoia, principalmente nos momentos difíceis, para que eu continue correndo atrás de realizar os meus sonhos e de me realizar profissionalmente.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Emanuella, Cíntia, Anas, Érike, Lara, Antônio e, novamente, ao Ronivaldo, com quem compartilhei tantos momentos bons, muitas risadas e muito café. Agradeço por terem tornado esta jornada mais simples, por me ajudarem a sempre enxergar o copo “meio cheio”.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, à qual agradeço.

RESUMO

As peptidases são enzimas pertencentes à classe das hidrolases (EC 3.4) que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. Quanto à posição da ligação a ser clivada na cadeia do substrato, as peptidases podem ser classificadas em endopeptidases ou exopeptidases. Este grupo de enzimas, em especial as de origem microbiana, apresenta grande importância comercial, por sua facilidade de produção e ampla variedade de aplicações industriais, como nas áreas de alimentos, farmacêuticas, detergentes, tratamento de pele animal para a produção de couro, tratamento de resíduos, entre outros. Para o período 2024-2029, conforme dados disponibilizados pela *Mordor Intelligence*, é estimado um crescimento anual de 6,0% para o mercado de peptidases. A expansão deste mercado justifica a prospecção de diferentes organismos, dos quais novas enzimas podem ser descobertas, com diferentes especificidades ao substrato, maior termoestabilidade, assim como uma redução no custo de produção. Desta forma, neste trabalho foi investigada a produção de peptidases pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F2.1.4 em cultivo submerso e caracterização bioquímica funcional das enzimas produzidas. Foram avaliadas as concentrações de 0,5 e 1% de caseína bovina como suplemento do meio de cultivo, mantido a 45°C. Dentre as condições avaliadas, o fungo exibiu maior produção de peptidases após 48 horas de cultivo suplementado com 0,5% de caseína. Quanto as enzimas produzidas, notou-se maior atividade caseinolítica em pH alcalino (9,5 – 10,5) e temperatura de 45-50°C para enzima pura e 50-55°C para o extrato fermentativo. Tanto as peptidases do extrato fermentativo quanto a enzima pura mantiveram mais de 50% de suas atividades após 1 hora a 50°C e foram estáveis em ampla faixa de pH (5.5-10.5), especialmente entre pH 5.5-8.0 (incubação por 24 horas a 4°C), cujas atividades proteolíticas se mantiveram acima de 85%. As atividades foram inibidas apenas por PMSF, o que sugere um mecanismo de ação de serino-peptidases. Na presença de diferentes íons metálicos, a atividade caseinolítica foi mais influenciada negativamente por cobre (II) e melhor modulada positivamente por cobalto, exibindo aumento de até 58% a 15 mM deste íon. O extrato fermentativo do cultivo mostrou-se eficaz na remoção de biofilmes microbianos de *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, alcançando até 72% de taxa de dispersão.

Palavras-chave: Bioprocesso. Enzima. Fungos. Protease. Proteína.

ABSTRACT

Peptidases are enzymes belonging to the hydrolase class (EC 3.4) that catalyze the hydrolysis of peptide bonds. Regarding the position of the cleaved bond in the substrate chain, peptidases can be classified as endopeptidases or exopeptidases. This group of enzymes, especially those of microbial origin, holds significant commercial importance due to their ease of production and a wide range of industrial applications, including in the fields of food, pharmaceuticals, detergents, animal skin treatment for leather production, waste treatment, among others. For the period 2024-2029, as per data provided by *Mordor Intelligence*, an annual growth of 6.0% is estimated for the peptidase market. The expansion of this market justifies the prospecting of different organisms, from which new enzymes with different substrate specificities, increased thermostability, as well as a reduction in production costs, may be discovered. Thus, in this study, it was investigated the production of peptidases by the thermophilic fungus *Myceliophthora heterothallica* F 2.1.4 in submerged culture and the functional biochemical characterization of the produced enzymes. Concentrations of 0.5% and 1% bovine casein were evaluated as supplements to the culture medium, maintained at 45°C. Among the conditions assessed, the fungus exhibited higher peptidase production after 48 hours of cultivation supplemented with 0.5% casein. Regarding the produced enzymes, higher caseinolytic activity was observed in alkaline pH (9.5 – 10.5) and a temperature range of 45-50°C for the pure enzyme and 50-55°C for the fermentative extract. Both the peptidases from the fermentative extract and the pure enzyme retained more than 50% of their activities after 1 hour at 50°C and were stable over a broad pH range (5.5-10.5), especially between pH 5.5-8.0 (incubation for 24 hours at 4°C), where proteolytic activities remained above 85%. The activities were inhibited only by PMSF, suggesting a serine peptidase action mechanism. In the presence of different metal ions, caseinolytic activity was negatively influenced by copper (II) and positively modulated by cobalt, showing an increase of up to 58% at 15 mM of this ion. The fermentative extract from the culture was effective in removing microbial biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, achieving up to a 72% dispersal rate.

Key-words: Bioprocess. Enzyme. Fungi. Protease. Protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Myceliophthora heterothallica</i> após 4 dias de cultivo em meio PDA.....	15
Figura 2 - Mecanismo de ação de peptidases	16
Figura 3 – Perfil da atividade enzimática durante 120 horas de cultivo submerso, 150 rpm, 45°C. (●) – 0,5% de caseína; (■) – 1% de caseína; (▲) – sem caseína	27
Figura 4 – SDS-PAGE 10%. Marcador de massa molecular (1) e peptidase pura do fungo <i>M. heterothallica</i> (2)	29
Figura 5 – Efeito de pH na atividade enzimática, do extrato fermentativo (●) e enzima pura (■)	30
Figura 6 – Efeito de pH na estabilidade enzimática após a incubação do extrato fermentativo (●) e da enzima pura (■) em diferentes pH, por 24 horas a 4°C.....	31
Figura 7 – Efeito de temperatura na atividade enzimática, extrato fermentativo (●) e enzima pura (■)	32
Figura 8 – Gráficos evidenciando resultados dos testes de estabilidade da atividade enzimática em diferentes tempos e temperaturas (●) – 15 min; (■) – 30 min; (▲) – 60 min. A – extrato fermentativo; B – enzima pura.....	33
Figura 9 - Dispersão de biofilme microbiano com tratamento por extrato fermentativo (atividade caseinolítica de ~6 U mL ⁻¹ e ~43 µg mL ⁻¹ de concentração final de proteínas) do cultivo submerso de <i>M. heterothallica</i> por 5 e 20 horas. Absorbância relativa à absorbância (595 nm) de biofilme corado com cristal violeta 1% (m/v) solubilizado em ácido acético glacial 30% (v/v) (A e B) e visualização da dispersão de biofilme (C – <i>C. albicans</i> e D – <i>S. aureus</i>).....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito de inibidores na atividade de peptidases presentes nos extratos fermentativos derivados de diferentes meios de cultivo e tempo de coleta.....	28
Tabela 2 - Purificação de uma serino peptidase do fungo <i>M. heterothallica</i>	29
Tabela 3 – Efeito de inibidores na atividade de peptidases presentes no extrato fermentativo e na enzima pura	35
Tabela 4 - Efeito de íons na atividade enzimática do extrato fermentativo.....	36
Tabela 5 - Efeito de íons na atividade enzimática da enzima pura	37
Tabela 6 - Efeito do íon cobalto na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura....	38

ABREVIATÓES UTILIZADAS

Asp – Ácido aspártico

AIA – Ácido Iodo Acético

Cys - Cisteína

DO – Densidade ótica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

EPNP - *1,2-epoxy-3-(p-nitrophe- noxy)propane*

Gly - Glicina

His - Histidina

LB – Luria Bertani

Lis - Lisina

PDA - *Potato Dextrose Agar* (ágar de dextrose de batata)

PMSF - *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (Fluoreto de fenil-metil-sulfonila)

SDS-PAGE - *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio)

Ser - Serina

TCA - *Trichloroacetic acid* (Ácido tricloroacético)

Thr - Treonina

SUMÁRIO

1. Introdução	12
2. Fundamentação teórica.....	12
2.1. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis	12
2.2. <i>Myceliophthora</i> sp.....	14
2.3. Peptidases	15
2.3.1. Serino peptidase	17
2.3.2. Outras peptidases.....	17
2.3. Aplicações de peptidases no âmbito industrial	19
2.4. Cultivo submerso e em estado sólido para a produção de enzimas por fungos filamentosos	21
3. Objetivos.....	22
4. Material e métodos.....	22
4.1. Microrganismo utilizado.....	22
4.2. Pré-inóculo.....	22
4.3. Cultivo submerso	22
4.4. Determinação de atividade proteolítica e concentração do extrato fermentativo.....	23
4.5. Concentração e purificação da enzima	23
4.6. Caracterização bioquímica funcional do extrato fermentativo e da enzima pura.....	24
4.6.1. Efeito de pH e temperatura na atividade enzimática	24
4.6.2. Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade enzimática	25
4.7. Remoção de biofilme.....	25
4.7.1. Cultivo do microrganismo e aplicação do extrato enzimático	25
4.8. Análise estatística	26
5. Resultados e discussão.....	27
5.1. Produção de peptidases em cultivo submerso.....	27
5.2. Efeito do pH na atividade enzimática.....	30
5.3. Efeitos de temperatura na atividade enzimática	32
5.4. Efeito de inibidores na atividade enzimática	34
5.5. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática.....	35
6. Conclusão	42
REFERÊNCIAS.....	43
APÊNDICE A: Efeito de inibidores na atividade das peptidases presentes nos extratos das fermentações coletadas em diferentes tempos (horas). A – Cultivo suplementado com 0,5% de caseína; B – cultivo suplementado com 1% de caseína; C – cultivo sem suplementação por caseína	49
APÊNDICE B: Efeito da temperatura na atividade de peptidases presentes no extrato fermentativo do cultivo de <i>M. heterothallica</i>	50
APÊNDICE C: Gráficos ilustrativos da influência de íons (5 mM) na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura.....	51
APÊNDICE D: Gráficos ilustrativos sobre a influência do íon cobalto na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura	52

1. Introdução

Enzimas são biomoléculas, em sua maioria de natureza proteica, capazes de catalisar reações químicas. Elas são naturalmente encontradas em animais, plantas e microrganismos, e atuam sob condições favoráveis de pH, temperatura e pressão (Filho; Silva; Guidini, 2019; Gopinath *et al.*, 2017). Apesar de poderem ser encontradas em diferentes organismos, a obtenção e o estudo de enzimas microbianas têm uma maior relevância em termos de produção e aplicação, devido a facilidade de isolamento de microrganismos, maior facilidade de manipulação genética, e baixo custo de produção em função de um período curto para cultivo microbiano (Gopinath *et al.*, 2017).

Enzimas são atrativos biocatalisadores para uso em processos industriais em substituições a tratamentos térmicos e químicos, sendo efetivas em reações com menor gasto energético e evitam uso de soluções ácidas e alcalinas de alta concentração, tornando o processo mais sustentável (Robinson, 2015). O uso de biocatalisadores reduz a necessidade da utilização de substratos com alta pureza e a geração de subprodutos descartáveis que seriam originados em um processo químico convencional (Filho; Silva; Guidini, 2019; Monteiro *et al.*, 2021).

De acordo com *Mordor Intelligence* (2024), em um relatório que avalia a aplicação industrial de enzimas proteolíticas, o mercado global de peptidases tem crescimento projetado de \$3,4 bilhões em 2024 para \$4,72 bilhões em 2029, um crescimento estimado de 6,0% ao ano de um mercado consolidado.

Peptidases respondem por aproximadamente 60% do mercado global de hidrolases, com destaque para aplicações em indústria de detergente, têxtil, alimentos, bebidas, farmacêutica e tratamento de resíduos. Diante desta variedade de aplicações, a prospecção por enzimas proteolíticas pode oferecer novas oportunidades de aplicação (de Souza *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2011).

2. Fundamentação teórica

2.1. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis

Dentre as variáveis ambientais que afetam o crescimento de microrganismos, a temperatura é uma das mais influentes. Isso se deve ao fato de que ela pode afetar diretamente o funcionamento de biomoléculas e a integridade celular. A maioria dos microrganismos conhecidos são adaptados a faixa de temperatura mesófila, entre 20 e 40°C. Entretanto,

evolutivamente, alguns grupos manifestaram adaptações para as quais temperaturas mais altas são necessárias para a sobrevivência. Estes microrganismos são, portanto, caracterizados como termofílicos e se desenvolvem na faixa de temperatura entre 45 e 70°C (Gomes *et al.*, 2007; Chernicharo, 2008). Existem, também, os chamados hipertermófilos que crescem em temperaturas entre 65 e 110°C. Microrganismos termofílicos e hipertermófilos têm diversos representantes procariotos dos domínios Archaea e Bacteria, no entanto, os eucariotos, contam apenas com representantes termofílicos, particularmente os fungos filamentosos, devido às limitações de seu complexo sistema de membranas. Dentre as espécies de fungos já descritas, aproximadamente 40 são termofílicas, sendo elas representantes de gêneros como *Canariomyces*, *Humicola*, *Melanocarpus*, *Myceliophthora*, etc (Gomes *et al.*, 2007, 2016).

Os fungos filamentosos formam o grupo de eucariotos com o maior número representantes termofílicos, microrganismos capazes de prosperarem em temperaturas entre 20 e 50°C, mas que têm ótimo desenvolvimento em temperaturas entre 45 e 50°C. Este diverso grupo conta, também, com representantes termotolerantes, capazes de crescerem em uma faixa de temperatura que se inicia um pouco abaixo dos 20°C até 55°C (Maheshwari; Bharadwaj; Bhat, 2000). Diversos trabalhos têm como objeto de estudo os fungos termofílicos, seja na busca de maior compreensão quanto aos mecanismos de adaptação destes microrganismos ou na exploração de seu potencial em aplicações industriais (Oliveira; Rodrigues, 2019).

O destaque destes fungos para a indústria deve-se a sua capacidade de produção de enzimas termoestáveis. A investigação destes microrganismos tem foco, principalmente, nas áreas de tecnologia enzimática e engenharia de proteínas. Em função da facilidade de obtenção de extratos enzimáticos se comparado a obtenção de enzimas associadas à célula, muitos estudos de prospecção são realizados com o cultivo dos fungos termofílicos para a produção e elaboração de metodologias para a purificação de enzimas, visando aplicações industriais (Maheshwari; Bharadwaj; Bhat, 2000; Salar, 2018).

Na biotecnologia, o interesse sobre estes microrganismos é significativo. A tendência mundial por tecnologias sustentáveis tem impulsionado a prospecção de enzimas microbianas, as quais podem beneficiar diversos bioprocessos industriais e também substituir alguns tratamentos industriais que empregam reagentes tóxicos. Por sua vez, o uso de enzima termoestáveis permite a condução de bioprocessos em temperaturas acima da faixa mesófila, portanto reduzindo a possibilidade de contaminação por microrganismos mesofílicos. Além disso, o uso de enzimas termoestáveis e microrganismos termofílicos para a condução de

bioprocessos em temperaturas elevadas também tem como vantagem uma maior solubilidade de substratos e produtos em função da menor viscosidade do meio de cultivo e, conseqüentemente, um aumento da taxa de reações bioquímicas catalisadas por estes microrganismos e enzimas. Sendo assim, microrganismos e enzimas termoestáveis ganham destaque para serem explorados nestes âmbitos (Atalah *et al.*, 2019; Gomes *et al.*, 2007; Salar, 2018).

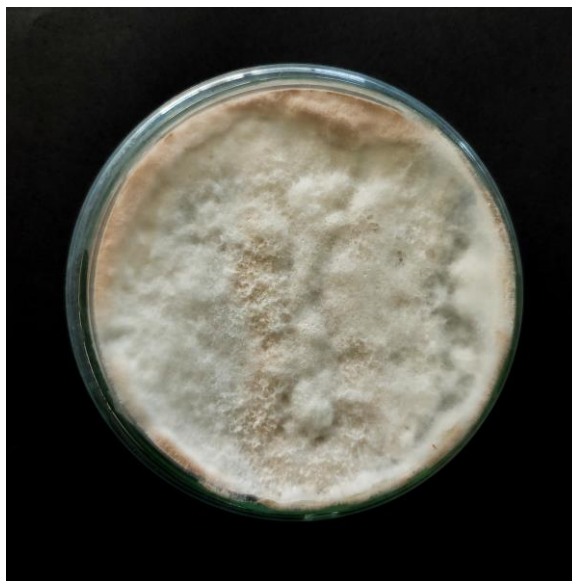
2.2. *Myceliophthora* sp.

O gênero *Myceliophthora* é representado por fungos ascomicetos filamentosos termofílicos (Zerva; Christakopoulos; Topakas, 2015). Estes microrganismos compõem um grupo de microrganismos anamorfos do gênero *Corynascus*. Recentemente, o fungo *M. thermophila*, espécie mais estudada do gênero em pesquisas aplicadas, teve seu genoma totalmente sequenciado, fato que torna este grupo ainda mais relevante frente a possibilidade de novos trabalhos (Van Den Brink *et al.*, 2012).

Alguns estudos exploraram enzimas de espécies do gênero *Myceliophthora* para a degradação de biomassa lignocelulósica e a expressão de lacases termoestáveis em diferentes microrganismos. Cepas da espécie *M. thermophila* foram capazes de se desenvolverem a 50°C e em substratos complexos, como palha de trigo e lascas de madeira (Van Den Brink *et al.*, 2012; Zerva; Christakopoulos; Topakas, 2015).

Contudo, não há muitos relatos sobre enzimas, especialmente peptidases, da espécie *M. hetherothallica* (Figura 1), evidenciando uma possibilidade de explorar este microrganismo de forma a contribuir com novas informações e aplicações.

Figura 1 – *Myceliophthora heterothallica* após 4 dias de cultivo em meio PDA



Fonte: Autoria própria (2024)

2.3. Peptidases

Peptidases, também chamadas de proteases e/ou enzimas proteolíticas (EC 3.4) são enzimas que atuam na clivagem, por meio da hidrólise, de ligações peptídicas presentes em peptídeos e proteínas. Desde o advento da enzimologia, esta classe é muito estudada em função das diversas aplicações no âmbito industrial, respondendo por aproximadamente 60% das hidrolases comercializadas no mercado global de enzimas (de Souza *et al.*, 2015; Gurumallesh *et al.*, 2019; Kumari *et al.*, 2015; Sumantha; Larroche; Pandey, 2006).

As enzimas proteolíticas não apresentam importância limitada apenas à aplicações industriais, mas também na manutenção metabólica dos organismos vivos em processos que variam de digestão, apoptose e síntese de biomoléculas, até processamento pós-traducional de proteínas indispensáveis para a manutenção da vida (de Souza *et al.*, 2015; Gurumallesh *et al.*, 2019). Essas enzimas podem realizar a quebra indiscriminada de ligações peptídicas, promovendo a degradação de substratos proteicos, ou podem realizar a hidrólise de ligações em regiões específicas de uma cadeia polipeptídica (de Souza *et al.*, 2015).

As peptidases podem ser classificadas, em função da posição de clivagem na cadeia peptídica, como exopeptidases, atuantes nas regiões C- e N- terminais da cadeia peptídica, e endopeptidases, clivando ligações peptídicas afastadas das regiões terminais (Figura 2) (Gurumallesh *et al.*, 2019; McDonald, 1985). As exopeptidases, por sua vez, ainda são subdivididas em aminopeptidases, que clivam ligações próximas da região N- terminal,

liberando um único, um di ou um tripeptídeo, e em carboxipeptidases, que atuam na região C-terminal, liberando um único ou um dipeptídeo (Mótyán; Tóth; Tőzsér, 2013).

Figura 2 - Mecanismo de ação de peptidases

EC - Peptidase	Mecanismo de ação
Aminopeptidases	
3.4.11 - Aminopeptidase	● ↓ ○-○-○-○---
3.4.14 - Dipeptidil peptidase	●-● ↓ ○-○-○---
3.4.14 - Tripeptidil peptidase	●-●-● ↓ ○-○---
3.4.16 - Serino carboxipeptidase	---○-○-○-○-○ ↓ ●
3.4.17 - Metallo carboxipeptidase	---○-○-○-○-○ ↓ ●
3.4.18 - Cisteino carboxipeptidase	---○-○-○-○-○ ↓ ●
3.4.15 - Dipeptidil peptidase	---○-○-○-○-○ ↓ ●-●
3.4.13 - Dipeptidase	● ↓ ●
Endopeptidases	
3.4.21 - Serino peptidases	
3.4.22 - Cisteino peptidases	
3.4.23 - Aspártico peptidase	----○-○-○ ↓ ○-○-○---
3.4.24 - Metallo peptidases	
3.4.25 - Treonino peptidases	
3.4.23.19 - Glutâmico peptidases	

Fonte: Rao *et al.*, 1998; Ward; Rao; Kulkarni, 2009; Silva, 2016. Figura modificada

Com relação ao sítio catalítico das peptidases, elas podem ser classificadas em serino peptidases, cisteino peptidases, aspártico peptidases, treonino peptidases e glutâmico peptidases, de acordo com o resíduo de aminoácido presente em seu sítio, e metalo peptidases em função da presença de um íon metálico auxiliando na catálise da hidrólise (Mótyán; Tóth; Tőzsér, 2013; Rawlings *et al.*, 2014).

2.3.1. Serino peptidase

O grupo das serino peptidases (EC 3.4.21) corresponde a mais de um terço de todas as enzimas proteolíticas conhecidas. Estas peptidases apresentam um resíduo de serina nucleofílica em seu sítio ativo, responsável pela atividade catalítica da enzima e dependente da tríade catalítica composta por resíduos de His, Asp e Ser (Di Cera, 2009; Ward, 2011). Algumas serino peptidases apresentam, em seu sítio ativo, díades catalíticas, compostas por resíduos de His ou Lis ligados a Ser nucleofílica, enquanto outras podem apresentar uma tríade composta por dois resíduos de His ligados a Ser catalítica (Di Cera, 2009). Estas enzimas apresentam ainda, como conformação do sítio ativo, resíduos de Gly associados a tríade catalítica (Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly, sendo “Xaa” e “Yaa” componentes da tríade catalítica) (Ward; Rao; Kulkarni, 2009).

As serino peptidases compõem um grupo de enzimas que apresentam, geralmente, ponto isoelétrico em pH 4-6 e atuam otimamente entre temperaturas (°C) 50-70 e pH 7-11 das quais as alcalinas são, normalmente, mais desejadas pelas indústrias coureiras e têxteis, para o tratamento de couro e lã; alimentícias, para o melhoramento do sabor de queijos e amaciamento de carnes; panificadoras, para o tratamento de farinhas; de rações, melhorando a digestibilidade dos alimentos produzidos por meio da hidrólise; e de detergentes, como aditivos para os produtos comercializados (Gurumallesh *et al.*, 2019; Sumantha; Larroche; Pandey, 2006; Ward; Rao; Kulkarni, 2009). Atualmente, o gênero *Bacillus* é o mais utilizado para a produção de serino peptidases alcalinas para, principalmente, aplicação nas indústrias de detergentes e alimentícias (Ward, 2011).

Este grupo de enzimas pode ser inibido por PMSF, DIFP, inibidores de tripsina, entre outros compostos (Sumantha; Larroche; Pandey, 2006).

Neste trabalho, uma serino peptidase foi produzida, purificada e caracterizada bioquímica funcionalmente.

2.3.2. Outras peptidases

As cisteíno peptidases (EC 3.4.22) são caracterizadas pela presença da díade catalítica, composta por resíduos de Cys e His, dos quais a Cys é responsável pelo ataque nucleofílico, em seu sítio ativo. Estas enzimas realizam a hidrólise de ligações peptídicas apenas na presença de agentes redutores, em função da tendência de oxidação do grupo tiol. O pH ótimo de atuação destas enzimas proteolíticas fica, normalmente, entre 4-6,5. Todos os organismos

vivos contam com a presença de cisteíno peptidases, que podem ser inibidas pelo ácido iodoacético, E-64, N-Etilmaleimida e por alguns outros compostos (Grzonka *et al.*, 2001; Gurumallesh *et al.*, 2019; Sajid; McKerrow, 2002; Silva, 2016).

As peptidases aspárticas (EC 3.4.23) são enzimas que estão presentes em organismos eucariotos e procariotos e são caracterizadas por apresentarem, em seu sítio catalítico, um par de resíduos de Asp. Estas enzimas atuam otimamente em pH ácido, normalmente, entre 3-4, e apresentam ponto isoelétrico entre pH 3-4,5. O par de Asp permanece ligado aos hidrogênios de uma molécula de água, a qual, por sua vez, será responsável por realizar o ataque nucleofílico para a quebra da ligação peptídica (Mandujano-González *et al.*, 2016; Sumantha; Larroche; Pandey, 2006). Este grupo de peptidases tem como principal inibidor a pepstatina, mas apresenta sensibilidade na presença de íons cobre (Mandujano-González *et al.*, 2016).

As chamadas metalo peptidases (EC 3.4.24) são enzimas proteolíticas que, para realizarem a hidrólise da ligação peptídica, dependem da presença de íons divalentes metálicos, normalmente o zinco. Este grupo é formado por enzimas de diferentes origens e com atividades de endo- e exopeptidases, sendo algumas delas collagenases, toxinas hemorrágicas de cobras e termolisinas bacterianas (Rao *et al.*, 1998; Ward, 2011). Este grupo de peptidases é inibido por agentes quelantes, normalmente o EDTA, e não são inibidos por reagentes que apresentam o grupo sulfidrila (Rao *et al.*, 1998; Ward, 2011).

Assim como os outros grupos de enzimas proteolíticas, exceto as metalo peptidases, as treonino peptidases (EC 3.4.24) são assim nomeadas em função da presença de um resíduo de Thr em seu sítio ativo. Este grupo foi descoberto em 1995 em estudos de cristalografia do proteossoma de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas enzimas são compostas por 14 subunidades e seu mecanismo catalítico não é muito bem compreendido, em função de sua dificuldade de inibição por inibidores de peptidases já descritos (Tschan; Mordmüller; Kun, 2011; Ward; Rao; Kulkarni, 2009). As informações encontradas na literatura sobre este grupo de enzimas ainda são bastante limitadas por ser um grupo pouco conhecido de peptidases.

As glutâmico peptidases (EC 3.4.23.19) formam o sexto grupo, recentemente descoberto, de peptidases. Encontradas inicialmente em *Scytalidium lignicolum*, estas enzimas foram primordialmente agrupadas no grupo das peptidases aspárticas, mas posteriormente reclassificadas em função de não demonstrarem sensibilidade a pepstatina e pela ausência de sequência similar às proteases aspárticas retrovirais (Kondo *et al.*, 2010). As

enzimas pertencentes ao sexto grupo de peptidases são endopeptidases que apresentam atividade em pH baixo e são inibidas por EPNP (Rawlings; Barrett, 2013).

2.3. Aplicações de peptidases no âmbito industrial

As peptidases são enzimas produzidas por plantas, animais e microrganismos. Tal abrangência se deve ao fato de que estas enzimas são essenciais para a manutenção da vida (Mótyán; Tóth; Tózsér, 2013; Razzaq *et al.*, 2019).

Industrialmente, as enzimas proteolíticas são muito exploradas, sendo dois terços das peptidases utilizadas no âmbito industrial provenientes de fontes microbianas (Mótyán; Tóth; Tózsér, 2013; Razzaq *et al.*, 2019; Sumantha; Larroche; Pandey, 2006). Há diversas aplicações para peptidases, como para recuperação de prata impregnadas em filmes de raio-X, aditivos na produção de detergentes, produção de hidrolisados proteicos, dentre outras (Razzaq *et al.*, 2019).

Na indústria alimentícia, enzimas proteolíticas podem ser utilizadas para melhorar a qualidade sensorial e digestibilidade de um alimento e até promover a degradação de compostos alergênicos de alguns produtos. No âmbito alimentício, os usos mais comuns de peptidases são para redução da turbidez em cervejas, causada pela suspensão de proteoglicanos; coagulação do leite pela clivagem da k-caseína para a produção de queijos e hidrólise parcial do glúten no preparo de massas para panificação (de Souza *et al.*, 2015; Ward, 2011).

A produção de hidrolisados proteicos, feita principalmente por peptidases alcalinas, possibilita a aplicação destes hidrolisados como aditivos alimentares, de forma a agregar valor nutricional ao alimento, assim como na produção de fórmulas infantis e também como flavorizantes (Gupta; Beg; Lorenz, 2002; Rao *et al.*, 1998; Razzaq *et al.*, 2019).

Na indústria coureira, a pele animal passa por um tratamento para a obtenção do couro acabado. Neste tratamento, a pele crua passa pela aplicação de substâncias alcalinas fortes combinadas com sulfeto de sódio para a solubilização de proteínas presentes nas raízes dos pelos no intuito de facilitar sua remoção. Contudo, em etapas seguintes do processo, um gás de alta toxicidade, conhecido como sulfeto de hidrogênio, pode ser formado como subproduto da produção do couro. Este gás é prejudicial para os trabalhadores que os manuseiam e o custo de tratamento de efluentes se torna mais caro pelo descarte correto destes compostos. O uso de enzimas em substituição ao sulfeto de sódio, por sua vez, evita a formação de

subprodutos poluentes e nocivos à saúde humana. Sendo assim, peptidases alcalinas com a capacidade de degradar as proteínas presentes nas raízes dos pelos, que não colágeno, podem ser empregadas como alternativa na produção do couro (de Souza *et al.*, 2015; Razzaq *et al.*, 2019; Ward, 2011). Peptidases também podem ser utilizadas no tratamento da seda, para a remoção da proteína sericina, que torna a fibra rugosa (Ward, 2011).

Na indústria de detergentes, peptidases são enzimas muito importantes na composição de produtos para a lavanderia doméstica, limpeza de lentes e de dentaduras. Subtilisinas são um grupo de serino-peptidases que apresentam como principais representantes as subtilisinas Carlsberg (produzidas por *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*) e as subtilisinas BPN' (produzidas por *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* e *B. subtilis*). O primeiro grupo, com pH ótimo de atividade entre 9-10, são as peptidases alcalinas que formam a primeira geração de enzimas proteolíticas utilizadas como aditivos em detergentes. A segunda geração, por sua vez, é formada por peptidases alcalinas de pH ótimo variando entre 11-12 e com termoestabilidade em temperaturas acima de 60°C (Razzaq *et al.*, 2019; Ward, 2011).

A prata impregnada em filmes fotográficos e raios-X pode ser recuperada por tratamentos hidrolíticos promovidos por peptidases. A prata é fixada nos filmes pela presença de uma camada de gelatina que, por sua vez, pode ser degradada por ação de peptidases collagenolíticas (Gupta; Beg; Lorenz, 2002).

Outra importante aplicação se dá na indústria de frangos. Esta indústria tem como principal resíduo as penas das aves, que representa cerca de 5% de sua massa corpórea. O uso de peptidases queratinolíticas é feito para degradar este material que, a princípio, seria descartado, mas é transformado em hidrolisado proteico com diferentes possibilidades de aplicação (Gupta; Beg; Lorenz, 2002; Razzaq *et al.*, 2019).

Enzimas proteolíticas podem, também, ser aplicadas para a remoção de biofilmes microbianos, uma vez que são capazes de clivar proteínas importantes na fixação e manutenção estrutural da matriz extra polissacarídica produzidas por microrganismos formadores de biofilmes, limitando e/ou desestabilizando a formação destas comunidades microbianas (Molobela; Cloete; Beukes, 2010; Nahar *et al.*, 2018).

2.4. Cultivo submerso e em estado sólido para a produção de enzimas por fungos filamentosos

Alguns fatores influenciam na eficiência de um bioprocesso realizado por cultivo de microrganismos e estes, por sua vez, podem ser divididos em três: físicos, químicos e biológicos. Duas formas distintas para realizar o cultivo de microrganismos são amplamente utilizadas em indústrias, que são os cultivos submerso e em estado sólido, e ambas apresentam suas vantagens e desvantagens (Hansen *et al.*, 2015; Singhanian *et al.*, 2010; Vaidyanathan *et al.*, 1999).

O cultivo submerso é caracterizado pela grande quantidade de água presente para a condução do bioprocesso. Este tipo de cultivo é o mais utilizado para a produção de enzimas em escalas industriais. As vantagens de realizar um bioprocesso submerso estão relacionadas principalmente a uma maior facilidade de manutenção de parâmetros que podem influenciar na eficiência do cultivo, como temperatura, pH e aeração. No entanto, alguns desafios são encontrados em bioprocessos submersos, principalmente com o uso de fungos filamentosos neste tipo de cultivo. Nestes casos, a repetibilidade de bioprocessos submersos realizados por fungos filamentosos é dificultada em função de sua natureza multicelular e da morfologia diversa e, além disso, enzimas produzidas podem ser degradadas por peptidases liberadas a partir da fragmentação das hifas, acontecimento comum para fungos filamentosos neste tipo de cultivo (Hansen *et al.*, 2015).

Ao contrário do submerso, o cultivo em estado sólido é caracterizado pela escassez de água e, quando comparados, a produção de enzimas por fungos filamentosos é significativamente maior no cultivo em estado sólido. Outro fator relevante é o menor gasto de energia com este tipo de cultivo por não haver a necessidade de um mecanismo de agitação do substrato. No entanto, existem desvantagens na realização do cultivo em estado sólido, como controlar o ganho e a perda calor para a manutenção da temperatura do cultivo e a baixa transferência de gases, problemas contornados em cultivos submersos. Os parâmetros físicos, químicos e biológicos são difíceis de serem controlados em bioprocessos quando em substratos sólidos. Além disso, contaminações são mais difíceis de serem monitoradas e a produção em larga escala de metabólitos microbianos em cultivo sólido também é dificultada (Fazenda *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2015). Por tais desvantagens, o cultivo submerso, mesmo utilizando-se fungos filamentosos, é a escolha mais frequente para a produção de bioprodutos no âmbito industrial (Fazenda *et al.*, 2008).

3. Objetivos

O objetivo geral deste estudo visou a produção e a caracterização bioquímica funcional de peptidases secretadas pelo fungo termofílico *Myceliophthora heterothallica* F 2.1.4.

Os objetivos específicos compreendem:

1. Produção de peptidases por cultivo submerso;
2. Determinação das propriedades bioquímicas funcionais de peptidases presentes no extrato fermentativo (efeito de pH e temperatura na atividade e estabilidade das peptidases, efeito de inibidores, etc.);
3. Purificar e avaliar as propriedades bioquímicas funcionais da peptidase pura.

4. Material e métodos

4.1. Microrganismo utilizado

O fungo filamentoso utilizado para a produção das enzimas proteolíticas por fermentação submersa foi o *Myceliophthora heterothallica* F 2.1.4. Este fungo pertence a coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, IBILCE/Unesp S.J. Rio Preto/SP e foi isolado e identificado conforme descrito por Zanthorlin *et al.*, (2010).

4.2. Pré-inóculo

Inicialmente, o fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio PDA, incubadas em estufa a 45°C por 96 horas. Em seguida, discos miceliais de 9,6 mm, foram utilizados para inocular os frascos de cultivo submerso.

4.3. Cultivo submerso

O cultivo submerso foi realizado em frascos Erlenmeyer de volume de 250 mL, vedados por tampões de algodão, contendo de 50 mL do meio composto por KH_2PO_4 - 0,07%; K_2HPO_4 - 0,02%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ - 0,01%; CaCl_2 - 0,01%; extrato de levedura - 0,1% e pH inicial 6,0. Foram preparados 3 lotes de cultivo, 2 suplementados com diferentes concentrações de caseína, sendo elas 0,5%, 1,0% e 1 sem suplementação com caseína. Os

frascos contendo o meio de cultivo foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a uma temperatura de 121°C, 1 atm.

Após a esterilização, em cada um dos Erlenmeyer foi inoculado um disco de micélio (9,6 mm de diâmetro) do fungo *M. heterothallica* F2.1.4. Os frascos de fermentação foram incubados a 45°C, 150 rpm por 120 horas. A cada 24 horas, durante todo o período de fermentação, foram retiradas triplicatas do cultivo, os quais foram filtrados em papel Whatman grade 1, centrifugados a 2267xg por 15 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi utilizado como extrato enzimático.

4.4. Determinação de atividade proteolítica e concentração do extrato fermentativo

A determinação da atividade proteolítica foi realizada de acordo com ensaio caseinolítico, com algumas modificações (Sarath; De La Motte; Wagner, 1996). A mistura reacional foi composta por 50 µL do extrato fermentativo enzimático e 450 µL de solução 1% de caseína (m/v) diluída em tampão fosfato de sódio monobásico 0,150 M, pH 6,5. A reação foi conduzida em microtubos a 40°C e interrompida, após 150 minutos, com a adição de 300 µL de ácido tricloroacético 10% (TCA). Para o controle negativo, a proporção foi mantida, mas o TCA 10% (m/v) foi adicionado antes do substrato da reação. Os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 6021xg, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 280 nm em espectrofotômetro UV-VIS. O experimento foi conduzido em triplicata.

Uma unidade de enzima (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para provocar o aumento de 0.01, por minuto, da absorbância a 280 nm (Merheb *et al.*, 2007).

4.5. Concentração e purificação da enzima

O segundo dia de cultivo (48 horas) suplementado com 0,5% de caseína, por apresentar uma maior atividade proteolítica, foi escolhido para dar continuidade aos experimentos de caracterização bioquímica funcional do extrato fermentativo. O volume total do extrato do cultivo (795 mL) foi concentrado usando o sistema QuixStand® (QSM-03SP, GE), equipado com um cartucho de membrana de corte 10 kDa. O volume final, após a concentração do extrato enzimático, foi de 120 mL.

A enzima pura foi obtida a partir da centrifugação do extrato fermentativo concentrado utilizando-se um concentrador Vivaspin *cut off* 30 kDa. Foram realizados 3 ciclos sequenciais de centrifugação a 188xg por 20 minutos a 4°C. O filtrado, apresentando atividade

caseinolítica, foi analisado por SDS-PAGE 10% (Laemmli, 1970), corado com nitrato de prata (See; Jackowski, 1989).

A quantificação de proteínas totais das amostras foi realizada utilizando a metodologia de Bradford (Bradford, 1976) utilizando soro albumina bovina como padrão.

4.6. Caracterização bioquímica funcional do extrato fermentativo e da enzima pura

4.6.1. Efeito de pH e temperatura na atividade enzimática

Estas avaliações foram realizadas em ensaios utilizando caseína 1% diluída em soluções tampão. A determinação do pH ótimo para a atividade da peptidase foi realizada a 40 °C, do pH 5,5 ao 11,0. Os tampões utilizados foram: MES (pH 5,5; 6,0 e 6,5), HEPES (pH 7,0; 7,5 e 8,0); BICINE (pH 8,5; 9,0) e CAPS (pH 9,5; 10,0; 10,5 e 11,0), todos a 0,2 M. A estabilidade por efeito de pH foi avaliada por incubação do extrato fermentativo e da enzima pura, durante 24 horas a 4°C, em diferentes pH (pH 5,5 ao 10,5).

O efeito de temperatura na atividade enzimática foi avaliado na faixa de temperatura de 30 a 65°C e, a estabilidade térmica, nos tempos de incubação de 15, 30 e 60 minutos, na faixa de temperatura de 30 a 65°C, com variação de 5°C.

Após o período de incubação, os ensaios caseinolíticos foram conduzidos nas condições ótimas de pH e temperatura pré-determinados.

4.6.2. Efeito de inibidores e íons metálicos na atividade enzimática

Para determinar o mecanismo de ação das peptidases, foi utilizado o protocolo descrito por Dunn (1989), com modificações. Foram utilizados os seguintes inibidores: EDTA, AIA e PMSF na concentração final de 5 mM. O mecanismo de ação foi investigado para o extrato fermentativo e para a enzima pura.

A atividade das peptidases também foi avaliada na presença dos seguintes sais na concentração final de 5 mM: cloretos de cobre (CuCl_2), ferro III (FeCl_3), cádmio (CdCl_2), mercúrio (HgCl_2), cobalto (CoCl_2), lítio (LiCl), sódio (NaCl), magnésio (MgCl_2), manganês (MnCl_2), potássio (KCl) e bário (BaCl_2). Em função da influência do íon Co^{2+} na atividade enzimática das enzimas também foi avaliada a atividade na presença de diferentes concentrações deste íon: 2,5, 5, 10, 15 e 20 mM. Os ensaios foram realizados utilizando o extrato fermentativo e a enzima pura.

Em todos os ensaios, as enzimas foram pré-incubadas por 5 minutos na temperatura de reação. As reações foram conduzidas no pH e na temperatura ótima de atividade enzimática.

4.7. Remoção de biofilme

Foram utilizados 2 microrganismos diferentes para o teste de remoção de biofilme, a levedura *Candida albicans* ATCC 90028 e a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, provenientes da coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP).

4.7.1. Cultivo do microrganismo e aplicação do extrato enzimático

O cultivo da levedura *C. albicans* foi realizado em placa de poliestireno de 6 poços contendo 1,5 mL de meio *Yeast Extract Potato Dextrose* (YEPD), a 30°C, por 5 dias de crescimento em condição estática com o inóculo inicial de 0,1 $\text{DO}_{600\text{nm}}$. No caso da bactéria *S. aureus*, o crescimento foi realizado em meio Luria Bertani (LB), a 37°C, por 7 dias.

Após o crescimento, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados três vezes com água destilada estéril e, em seguida, foram adicionados 2 mL de extrato fermentativo concentrado do cultivo de *M. heterothallica* e 1 mL de tampão CAPS, 0,2 M, pH 10. Desta forma, o extrato fermentativo apresentou concentração final de $\sim 6 \text{ U mL}^{-1}$ de unidade enzimática e $\sim 43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteínas totais. Um poço contendo 2 mL de enzima inativada por aquecimento e 1 mL de tampão foi utilizado como controle. O experimento foi

conduzido na temperatura de cultivo dos microrganismos avaliados para a formação de biofilme.

Posteriormente, a solução enzimática foi removida e foram adicionados 2 mL de metanol em cada poço e a placa de poliestireno foi levada a uma estufa de secagem a 60°C por 1 h. Logo após, foram adicionados 3 mL de cristal violeta 1% (m/v) e a placa foi incubada por 20 min a 25°C. Passado o tempo de incubação, a coloração foi removida e os poços foram lavados com água destilada e, em seguida, retornaram a uma estufa de secagem, durante 1 h a 40°C.

Depois de seca, a placa foi fotografada e a remoção de biofilme foi quantificada pela adição de ácido acético glacial 30% (v/v) e posterior leitura em espectrofotômetro a 595 nm (Saggu; Jha; Mishra, 2019). O controle foi utilizado como referência e considerado como 100%. O experimento foi realizado em duplicata.

Foram realizados ensaios caseinolíticos para estimar a quantidade de unidade enzimática (U) e ensaios para a quantificação de proteínas totais presentes no extrato enzimático.

4.8. Análise estatística

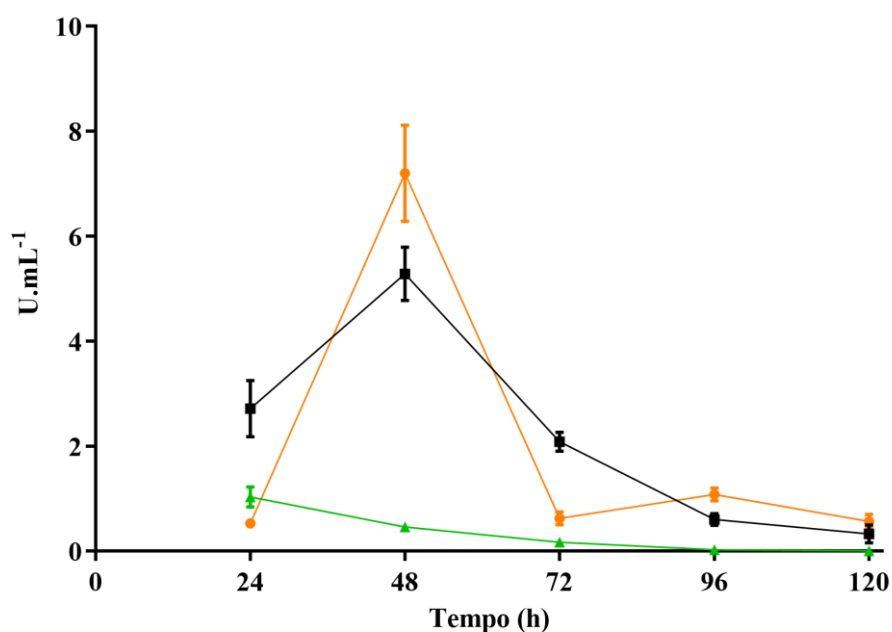
O software GraphPad Prism 10 foi utilizado para calcular variância estatística (ANOVA e Teste t não pareado). Diferenças entre amostras foram consideradas estatisticamente significantes se $p > 0,05$.

5. Resultados e discussão

5.1. Produção de peptidases em cultivo submerso

Foi possível observar que o perfil de cultivo do fungo termofílico *M. heterothallica*, em meios de cultivo suplementados com 0,5%, 1% de caseína (m/v), após 48 horas, apresentou maior atividade enzimática (U mL^{-1}) quando comparado aos outros tempos avaliados (Figura 3). No entanto, o cultivo suplementado por 0,5% de caseína evidenciou, em ensaios caseinolíticos, atividade enzimática máxima após 48 horas ($\sim 8 \text{ U mL}^{-1}$) quando comparada ao inóculo com 1% ($\sim 6 \text{ U mL}^{-1}$), enquanto esta apresentou atividade enzimática melhor distribuída durante as 72 horas iniciais do cultivo. O cultivo sem suplementação, apresentou baixa atividade enzimática e atingiu sua máxima ($\sim 1,2 \text{ U mL}^{-1}$) após 24 horas. Sendo assim, tem-se que a suplementação com caseína foi capaz de induzir maior produção de peptidases no fungo.

Figura 3 – Perfil da atividade enzimática durante 120 horas de cultivo submerso, 150 rpm, 45°C. (●) – 0,5% de caseína; (■) – 1% de caseína; (▲) – sem caseína



Fonte: Autoria própria (2024)

Em um trabalho utilizando o fungo *Aspergillus fumigatus*, Silva *et al.* (2013) suplementaram o meio de cultivo com caseína e avaliaram o efeito de diferentes concentrações deste indutor. As maiores atividades observadas neste trabalho foram referentes

a 72 horas de cultivo com 0,5% de caseína e 96 horas com 0,25%. A concentração de 1% também foi avaliada neste trabalho e a atividade máxima foi cerca de 1,5 vez menor quando comparadas às concentrações menores de caseína. Isto pôde, também, ser observado nos resultados obtidos neste trabalho. Mehta; Thumar; Singh (2006) avaliaram diferentes concentrações de indutores no cultivo para a produção de peptidases e, por sua vez, encontraram resultados semelhantes que mostram que, dependendo da concentração do substrato do cultivo, o mesmo pode auxiliar ou atuar como um inibidor na produção de enzimas.

Com o intuito de comparar o perfil de peptidases produzidas durante os cultivos, foi realizado o teste com inibidores específicos de serino, cisteíno e metalo peptidases utilizando os extratos fermentativos que apresentaram atividade caseinolítica elevada de cada fermentação (Tabela 1). Em todos os ensaios, foi observado o efeito de inibição da atividade enzimática por PMSF, indicando a presença de peptidases do grupo “serino-peptidase”.

Tabela 1 – Efeito de inibidores na atividade de peptidases presentes nos extratos fermentativos derivados de diferentes meios de cultivo e tempo de coleta

Fermentação	Inibidores (5 mM)			
-	Controle	AIA	EDTA	PMSF
0,5% - 48 h	100 ± 1,82	94,85 ± 4,32	98,67 ± 2,13	0,46 ± 0,08
0,5% - 96 h	100 ± 6,94	93,38 ± 7,70	98,94 ± 5,69	9,39 ± 3,85
1,0% - 24 h	100 ± 4,89	104,66 ± 7,60	99,62 ± 4,36	4,98 ± 0,82
1,0% - 48 h	100 ± 3,63	96,75 ± 5,26	99,05 ± 3,20	3,88 ± 0,63
1,0% - 72 h	100 ± 9,04	82,57 ± 6,05	89,97 ± 11,15	0,15 ± 0,26
S/ caseína – 24 h	100 ± 5,63	92,83 ± 5,43	96,23 ± 5,99	0,41 ± 0,71

Fonte: Autoria própria (2024)

5.2. Purificação da enzima

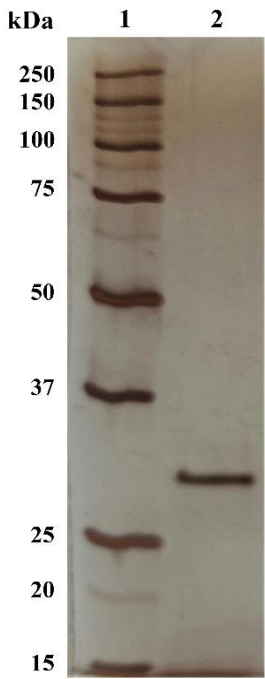
Após a passagem do extrato enzimático concentrado por um concentrador Vivaspin *cut off* 30 kDa e análise por SDS-PAGE 10% (Figura 4), foi possível observar que a porção filtrada do nosso extrato enzimático era uma fração pura da peptidase (Tabela 2) com massa molecular estimada em 31 kDa.

Tabela 2 - Purificação de uma serino peptidase do fungo *M. heterothallica*

Etapas da purificação	Atividade total (U)	Proteína total (mg)	Atividade específica (U/mg)	Rendimento (%)	Purificação
Extrato fermentativo (FSm)	21171,70	41,61	508,81	100,00	1,00
Extrato concentrado	6564,14	14,67	447,45	31,00	0,88
Enzima pura	1830,03	3,18	575,48	8,64	1,13

Fonte: Autoria própria (2024)

Figura 4 – SDS-PAGE 10%. Marcador de massa molecular (1) e peptidase pura do fungo *M. heterothallica* (2)

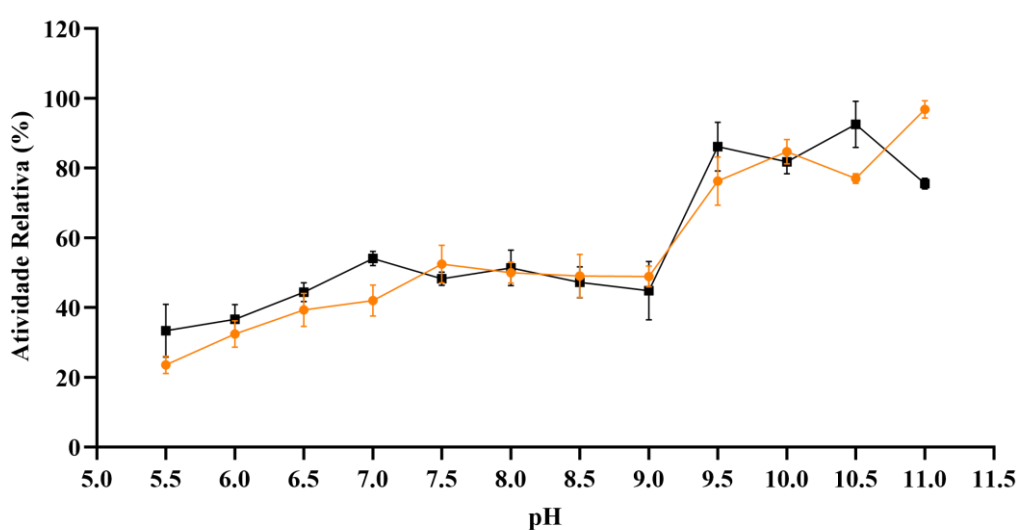


Fonte: Autoria própria (2024)

5.2. Efeito do pH na atividade enzimática

A influência do pH, ao ser avaliada, permitiu a observação um perfil semelhante de atividade enzimática, tanto para o extrato fermentativo quanto para a enzima pura, com maior atividade caseinolítica em pH alcalino (Figura 5). Dentre os valores de pH avaliados, os ensaios seguintes foram conduzidos em pH 10 pelo fato de a enzima exibir atividade elevada e, nos pH 9,5 e 10,5, não apresentar grandes variações em sua atividade.

Figura 5 – Efeito de pH na atividade enzimática, do extrato fermentativo (●) e enzima pura (■)

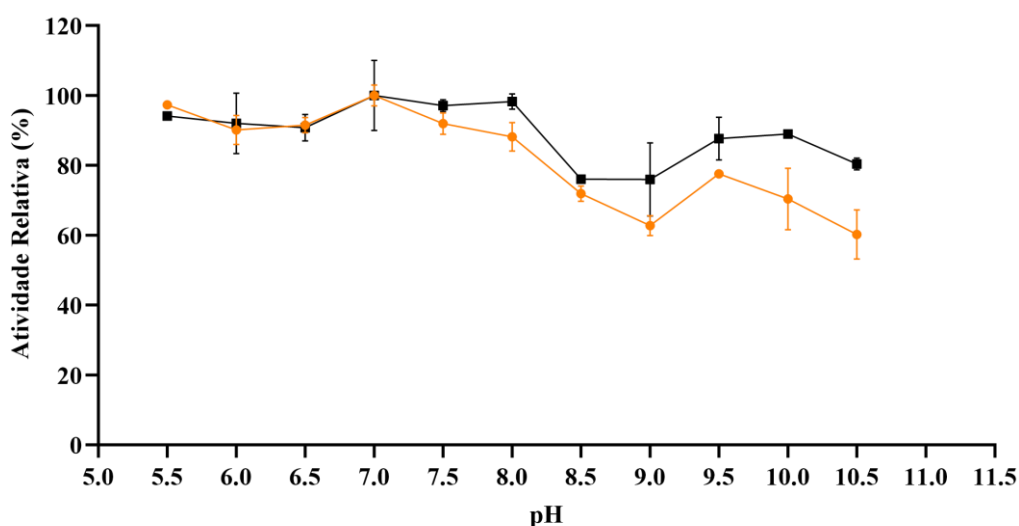


Fonte: Autoria própria (2024)

A estabilidade enzimática também foi avaliada ao serem incubadas em diferentes pH. Considerando toda a faixa de pH estudada e utilizando a atividade em pH 7,0 como 100%, tanto para o extrato fermentativo quanto para a enzima pura, a atividade relativa mínima detectada foi de 60% (pH 9,0 e 10,5), para o extrato fermentativo, com destaque para maior estabilidade entre pH 5,5-8, na qual a atividade proteolítica foi mantida acima de 85% (Figura 6). No entanto, para a enzima pura, é possível observar diferença significativa na estabilidade nos pH 8,5, 9,0 e 10,5, onde a atividade relativa mínima foi de 75% e mais evidenciada nos pH 8,5 e 9,0. É possível observar, também, este perfil no extrato fermentativo. A queda na atividade pode estar relacionada com a presença do tampão BICINE, utilizado apenas nos ensaios conduzidos nestes pH onde a redução da atividade foi mais pronunciada. Em suma, a enzima pura se mostrou estável em uma ampla faixa de pH (5,5-10,5) além da sua faixa ótima de atividade. Isto também foi observado para o extrato fermentativo, porém, a interferência de

outras biomoléculas e possível presença de outras peptidases pode ter influenciado na maior estabilidade em pH neutro.

Figura 6 – Efeito de pH na estabilidade enzimática após a incubação do extrato fermentativo (●) e da enzima pura (■) em diferentes pH, por 24 horas a 4°C



Fonte: Autoria própria (2024)

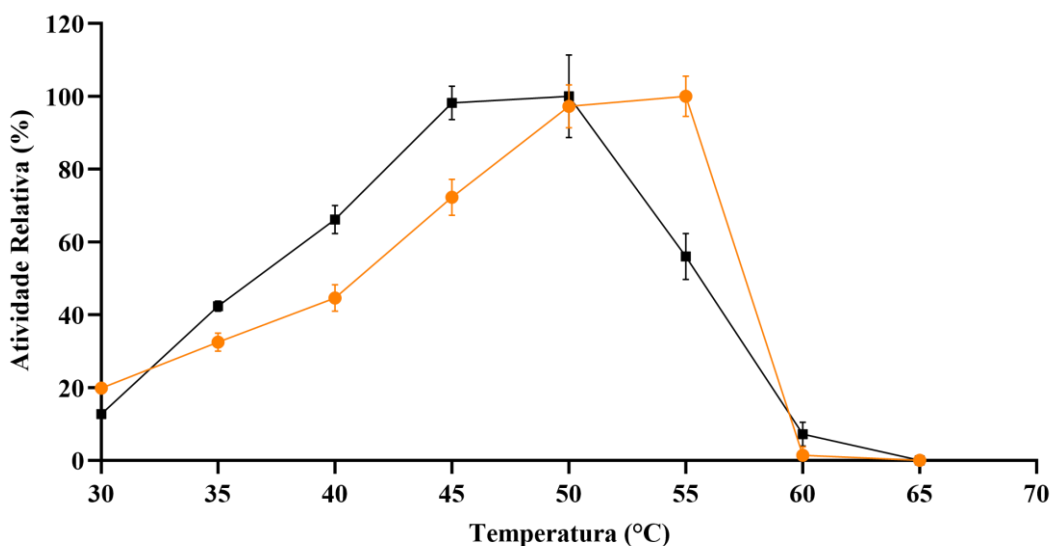
Peptidases alcalinas provenientes de fungos termofílicos também foram descritas por Li; Yang; Shen (1997), produzida por *Thermomyces lanuginosus* e Zanthorlin *et al.* (2010), produzida por *Myceliophthora* sp.

Para aplicações em indústrias, peptidases alcalinas são muito estudadas, principalmente como aditivos na produção de detergentes. Além desta, existem outras aplicações para estas peptidases, como nas indústrias coureira, farmacêutica e alimentícia (Razzaq *et al.*, 2019; Zanthorlin *et al.*, 2010). Laxman *et al.* (2004), por exemplo, reivindicaram a patente de uma peptidase alcalina produzida por *Conidiobolus coronatus* para seu uso no preparo do couro, atuando em pH alcalino *overnight* (18 horas) em temperatura ambiente. A enzima em questão mostrou-se estável e eficiente no tratamento de peles de animais.

5.3. Efeitos de temperatura na atividade enzimática

Nos ensaios para avaliar os efeitos da temperatura na atividade enzimática foi possível observar um perfil semelhante entre o extrato fermentativo e a enzima pura; temperatura ótima para atividade a 50-55°C para enzimas do extrato fermentativo e 45-50°C para a enzima pura (Figura 7). No entanto, as enzimas do extrato mostraram-se estáveis a 55°C, com 100% da atividade, enquanto a enzima pura exibiu cerca de 60% de sua atividade na mesma temperatura. Portanto, os ensaios seguintes foram realizados a 50°C, nos quais a enzima alcançou 100% de sua atividade sem prejuízos durante a reação caseinolítica.

Figura 7 – Efeito de temperatura na atividade enzimática, extrato fermentativo (●) e enzima pura (■)



Fonte: Autoria própria (2024)

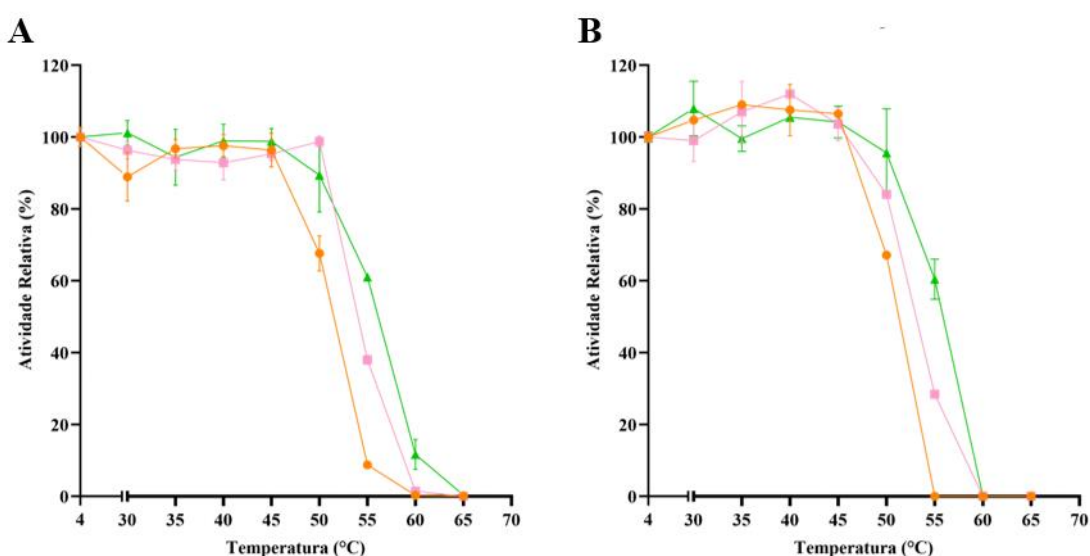
Zanphorlin *et al.* (2010) apresentaram resultados similares aos obtidos neste estudo ao caracterizarem uma peptidase obtida por cultivo em estado sólido (FES) de um fungo termofílico do gênero *Myceliophthora*. A enzima em questão, no extrato fermentativo, mostrou melhor atividade a 50°C. Li *et al.* (2007) obtiveram uma serino-peptidase proveniente do fungo termofílico *Chaetomium thermophilum* que apresentou atividade ótima a 65°C.

Oztas Gulmus; Gormez (2020) utilizaram uma peptidase produzida pela bactéria termofílica *Thermomonas haemolytica* para a remoção de manchas de sangue e de grama em

tecido de roupas. A enzima apresentou atividade ótima a 55°C, em pH 9,0 e mostrou-se eficiente, quando em conjunto com detergente, para a remoção destas manchas.

Nos ensaios de termoestabilidade, foi possível notar que tanto as enzimas do extrato fermentativo quanto a enzima pura, nas temperaturas entre 30 e 45°C, mostraram-se estáveis por 60 min, com atividade próxima a 100% (Figura 8). Uma pequena diferença foi observada a partir da temperatura de 50°C, onde a enzima pura, incubada por 30 min, evidenciou uma queda em sua atividade, que se manteve acima de 80%, diferentemente do extrato fermentativo, na faixa de 100%. A 55°C, a atividade proteolítica remanescente para ambas as amostras foi de cerca de 60% após 15 min de incubação, e perda da atividade quando incubadas em temperaturas a partir de 60°C.

Figura 8 – Gráficos evidenciando resultados dos testes de estabilidade da atividade enzimática em diferentes tempos e temperaturas (●) – 15 min; (■) – 30 min; (●) – 60 min. **A** – extrato fermentativo; **B** – enzima pura



Fonte: Autoria própria (2024)

A temperatura elevada é um fator limitante para a utilização de enzimas em bioprocessos industriais devido a suscetibilidade destas proteínas que atuam, normalmente, em temperaturas na faixa de 25 a 40°C (Che Hussian; Leong, 2023; Deeth, 2021). A estabilidade estrutural das enzimas, assim como das proteínas em geral, depende de diversas interações de forças não covalentes como as ligações de hidrogênio, força de van der Waals e interações hidrofóbicas. O aumento da temperatura pode provocar perturbações nestas

interações, permitindo que a enzima perca sua conformação original, o que leva a desorganização de seu sítio catalítico, inativando-a (Gomes *et al.*, 2007; Robert; Cadet, 1996). A inativação enzimática pela temperatura pode ser reversível se a proteína for resfriada rapidamente, mas a exposição prolongada a altas temperaturas reduz a atividade residual da enzima quando esta é resfriada novamente (Robert; Cadet, 1996).

Enzimas termoestáveis são comumente produzidas por microrganismos termofílicos e apresentam características atrativas para o uso industrial. A condução de bioprocessos em altas temperaturas reduz o risco de contaminação por microrganismos mesofílicos, diminui a viscosidade do meio e, desta forma, aumenta a taxa de reações catalisadas por enzimas devido a maior solubilidade de substratos e produtos. As características estruturais de enzimas termoestáveis estão relacionadas, também, com maior tolerância na presença de solventes orgânicos e outros agentes desnaturantes. Estes atributos das enzimas termoestáveis tornam relevante a prospecção destas proteínas como alternativa para enzimas mesofílicas de menor eficiência (Cowan, 1997; Elleuche *et al.*, 2015; Gomes *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2019).

Ao avaliar a influência da temperatura na estabilidade de peptidases produzidas por um fungo termofílico do gênero *Myceliophthora*, Zanthorlin (2010) obteve resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, onde a enzima, em extrato fermentativo, mostrou-se estável por 5 horas a 50°C, mas perdia atividade quando incubada a temperaturas a partir de 55°C.

Enzimas proteolíticas, quando termoestáveis e eficazes em pH alcalino, ao serem aplicadas como aditivos em detergentes, permitem que o produto seja utilizado para realizar lavagens em altas temperaturas e pH (Li *et al.*, 2007).

5.4. Efeito de inibidores na atividade enzimática

Com a avaliação de efeito de inibidores de cisteíno, metalo e serino peptidases nas amostras enzimáticas, pode-se observar que há a inibição total da atividade de ambas por PMSF (Tabela 3). Este composto inibe a atividade de serino proteases, o que sugere que esta é a classe da peptidase encontrada neste estudo.

As serino peptidases alcalinas, principalmente provenientes de microrganismos do gênero *Bacillus*, são amplamente utilizadas na indústria de detergentes (Razzaq *et al.*, 2019).

Tabela 3 – Efeito de inibidores na atividade de peptidases presentes no extrato fermentativo e na enzima pura

Inibidores (5 mM)	Extrato fermentativo	Enzima pura
Controle	100,00 ± 1,79	100,00 ± 2,00
AIA	99,35 ± 0,94	98,62 ± 2,09
EDTA	91,00 ± 4,47	98,20 ± 0,79
PMSF	0,25 ± 0,50	0

Fonte: Autoria própria (2024)

Hajji *et al.* (2007) purificaram uma serino peptidase de *Aspergillus clavatus* e esta, por sua vez, apresentou características interessantes para a aplicação em detergentes, em função da alta atividade proteolítica em pH alcalino, pico de atividade a 50°C e estabilidade a diversos surfactantes e agentes branqueadores, compostos que, normalmente, fazem parte da composição de detergentes.

Duffeck *et al.* (2020) produziram queratinases a partir da degradação de penas de frango pelo fungo *Corioloropsis byrsina*. Estas enzimas exibiram atividade elevada em pH alcalino e atividade residual de 63% após 1 hora a 50°C, algumas características semelhantes às da peptidase produzida pelo *M. heterothallica* no presente trabalho. Em teste de aplicação em detergentes, as enzimas produzidas pelo *C. byrsina* mostraram-se estáveis como aditivos em detergente líquido e, liofilizadas, em detergente em pó. Além disso, o trabalho avaliou a capacidade de remoção de manchas de ovo em tecido de algodão por detergentes comerciais e com as enzimas de *C. byrsina*, evidenciando similaridade com o produto comercial.

5.5. Efeito de íons metálicos na atividade enzimática

Pela avaliação do efeito de íons metálicos na atividade enzimática do extrato fermentativo (Tabela 4), considerando $p = 0,1$, evidencia-se um aumento de 15-28% na atividade quando na presença dos íons ferro (aprox. +15%) e cobalto (aprox. +28%). No entanto, outros íons influenciaram negativamente na atividade enzimática, provocando redução de 13-69% da atividade, destacando-se os íons potássio (aprox. -13%), manganês (aprox. -14%), mercúrio (aprox. -32%) e cobre (II) (aprox. -69%).

Tabela 4 - Efeito de íons na atividade enzimática do extrato fermentativo

Íons (5 mM)	Atividade caseinolítica (%)
Controle	100,00 ± 5,11
CuCl ₂	31,04 ± 5,25
FeCl ₃	115,22 ± 3,47
CdCl ₂	95,36 ± 3,70
HgCl ₂	68,20 ± 1,83
CoCl ₂	127,69 ± 5,40
LiCl	92,20 ± 2,78
NaCl	92,13 ± 2,09
MgCl ₂	97,65 ± 3,31
MnCl ₂	86,43 ± 3,48
KCl	87,31 ± 5,52
BaCl ₂	94,14 ± 3,18

Fonte: Autoria própria (2024)

Em ensaios utilizando a enzima pura, a peptidase teve sua atividade modulada por alguns íons (Tabela 5). Dentre eles, os que influenciaram positivamente de forma significativa (considerando $p = 0,1$) foram os íons potássio (aprox. +18%), bário (aprox. +24%) e o cobalto (aprox. +39%). Neste caso, os íons mercúrio e cobre (II) afetaram a enzima de forma negativa reduzindo sua atividade em aproximadamente 28% e 89%, respectivamente.

Tabela 5 - Efeito de íons na atividade enzimática da enzima pura

Íons (5 mM)	Atividade caseinolítica (%)
Controle	100,00 ± 4,46
CuCl ₂	11,44 ± 5,31
FeCl ₃	99,30 ± 4,62
CdCl ₂	103,26 ± 1,50
HgCl ₂	72,15 ± 6,61
CoCl ₂	138,75 ± 6,70
LiCl	101,04 ± 3,85
NaCl	104,64 ± 5,56
MgCl ₂	94,16 ± 5,20
MnCl ₂	104,62 ± 9,25
KCl	118,39 ± 3,17
BaCl ₂	123,88 ± 3,65

Fonte: Autoria própria (2024)

A atividade enzimática pode ser modulada positiva ou negativamente na presença de íons metálicos, que podem interagir com o substrato da reação e/ou com a estrutura ou sítio ativo da enzima, como foi possível observar no aumento da atividade na presença do íon cobalto e redução na presença dos íons manganês, mercúrio e cobre (II) (Silva *et al.*, 2019).

A presença do íon mercúrio provocou a redução da atividade proteolítica da enzima e isto se deve, provavelmente, à afinidade deste íon com radicais sulfidríla, que podem ser encontrados em resíduos de Cys presentes na estrutura da enzima. Esta interação, pode ocasionar mudanças conformacionais em sua estrutura, causando a inibição não competitiva de sua atividade catalítica (Mahbub *et al.*, 2016).

O cobre, por sua vez, inibiu quase totalmente a atividade enzimática nos ensaios contendo-o. Possivelmente, isto ocorreu por uma interação do íon com o sítio ativo da peptidase, impedindo a interação adequada com o substrato, como observado e também suposto no trabalho de Silva *et al.* (2019).

Zanphorlin *et al.* (2011) purificaram e caracterizaram uma serino peptidase de um fungo termofílico *Myceliophthora* sp. que teve aumento em sua atividade na presença de íon

magnésio, mas apresentou redução significativa da atividade na presença dos íons mercúrio e níquel e foi totalmente inibida na presença de íon cobre (II). Couto *et al.* (2022) obtiveram uma serino peptidase que apresentou melhora na atividade catalítica na presença de íons cobre (II), zinco, sódio e cálcio.

Em virtude da melhora da atividade enzimática da serino peptidase pela presença do íon cobalto, foram conduzidos ensaios caseinolíticos utilizando diferentes concentrações deste íon (Tabela 6) para avaliar seu efeito na atividade enzimática.

Foi possível observar um aumento significativo da atividade enzimática na presença do íon em todas as concentrações avaliadas nos ensaios tanto do extrato fermentativo quanto para a enzima pura, com destaque para as concentrações de 10,0, 15,0 e 20,0 mM, aumentando a atividade entre 35-37% para o extrato fermentativo e entre 53-58% para a enzima pura (Tabela 6). Seja atuando como cofator, coenzima ou se ligando a sítios não específicos, a presença do íon cobalto nos ensaios pode ter auxiliado e melhorado o acesso da enzima ao substrato e/ou na estabilidade da estrutura proteica (Yang, 2009; Yang *et al.*, 2010).

Tabela 6 - Efeito do íon cobalto na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura

	[mM]	Extrato fermentativo	Enzima pura
COBALTO	Controle	100,00 ± 1,63	100,00 ± 4,40
	2,5	118,59 ± 2,76	135,60 ± 4,58
	5,0	120,64 ± 3,04	130,46 ± 8,24
	10,0	125,82 ± 2,53	135,11 ± 5,31
	15,0	137,17 ± 7,76	158,42 ± 6,05
	20,0	134,67 ± 6,82	152,88 ± 6,91

Fonte: Autoria própria (2024)

Yadav *et al.* (2015) caracterizaram uma serino peptidase alcalina e observaram aumento da atividade enzimática na presença de íons sódio e potássio nas concentrações de 2 e 5 mM, mas os mesmos íons apresentaram efeito inibitório na concentração de 10 mM. Peña-

Montes *et al.* (2008) produziram uma peptidase alcalina com ampla especificidade de substrato que teve sua atividade intensificada na presença dos íons ferro (II) e cobalto a 1 mM, mas registrou redução quando na presença de ferro (II) a 10 mM.

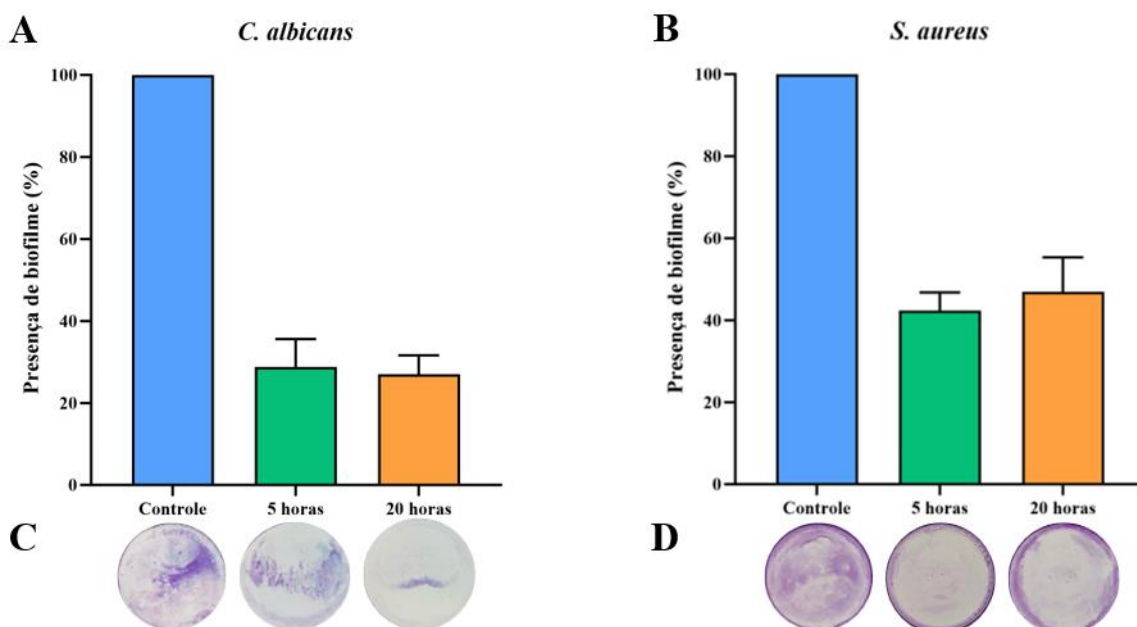
5.6. Aplicação do extrato fermentativo de *M. heterothallica* para remoção de biofilmes microbianos

A combinação de detergentes e enzimas, em especial as proteolíticas, é utilizada para a melhora da capacidade de desinfecção destes produtos. A atuação de surfactantes em união com peptidases é explorada por aumentar a molhabilidade de biofilmes microbianos e, consequentemente, facilitar sua remoção (Simões; Simões; Vieira, 2010).

No atual trabalho, optou-se pela aplicação de apenas o extrato fermentativo concentrado obtido do cultivo do fungo *M. heterothallica*. Pesquisas, como as reportadas por de Menezes *et al.* (2023) e Baidamshina *et al.* (2017), utilizaram o extrato fermentativo contendo queratinases e uma enzima proteolítica, respectivamente, sem a combinação com outros aditivos para avaliar a capacidade de remoção de biofilme das enzimas estudadas.

No presente trabalho avaliamos a capacidade de remoção de biofilme formado por dois microrganismos distintos: *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (Figura 9). Quando aplicado no biofilme de *C. albicans*, o extrato fermentativo, que apresentou atividade caseinolítica $\sim 6 \text{ U mL}^{-1}$ e concentração final total de proteínas $\sim 43 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, dispersou em torno de 72% do biofilme estabelecido após 5 dias, em ambos tempos avaliados, sem diferença significativa entre eles. Nos ensaios com o biofilme estabelecido por 7 dias de *S. aureus*, o extrato fermentativo também foi efetivo e capaz de dispersar entre 53-58% do biofilme bacteriano, não evidenciando diferença significativa entre os tempos avaliados. A amostra controle representa a incubação dos biofilmes com o extrato enzimático inativo por desnaturação térmica das enzimas (incubação a 100°C por 10 min).

Figura 9 - Dispersão de biofilme microbiano com tratamento por extrato fermentativo (atividade caseinolítica de $\sim 6 \text{ U mL}^{-1}$ e $\sim 43 \mu\text{g mL}^{-1}$ de concentração final de proteínas) do cultivo submerso de *M. heterothallica* por 5 e 20 horas. Absorbância relativa à absorbância (595 nm) de biofilme corado com cristal violeta 1% (m/v) solubilizado em ácido acético glacial 30% (v/v) (A e B) e visualização da dispersão de biofilme (C – *C. albicans* e D – *S. aureus*)



Fonte: Autoria própria (2024)

Com o uso do extrato fermentativo obtido a partir da degradação de penas de frango pela bactéria *Ochrobactrum intermedium*, de Menezes *et al.* (2023) reportaram a remoção de 60% de biofilmes de *S. aureus* após 24 horas de incubação do extrato enzimático. Baidamshina *et al.* (2017) relataram remoção de 40 e 50% do biofilme de *S. aureus* utilizando, respectivamente, tripsina e papaína a uma concentração de 1 mg mL^{-1} . Al-Fattani; Douglas (2006) testaram diversas enzimas para a remoção de biofilme formado por *C. albicans* e, dentre as utilizadas, a proteinase K, uma serino peptidase de amplo espectro de ação, foi capaz de dispersar cerca de 30% dos biofilmes após 2 horas de aplicação na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Substâncias poliméricas extracelulares (EPS) secretadas por células microbianas formadoras de biofilme aumentam a adesão de células microbianas a uma superfície. Esta matriz polimérica, que pode incluir lipídeos, DNA, proteínas e polissacarídeos, contribui para aumentar a resistência do biofilme a agentes biocidas e a condições estressantes do ambiente, como variação de temperatura, exposição a UV e desidratação (Yin *et al.* 2019). Em vista

disso, a hidrólise destas substâncias favorece a dispersão de biofilmes e pode melhorar a efetividade de agentes antimicrobianos, como antibióticos e desinfetantes.

A hidrólise de proteínas que compõem a matriz polimérica de biofilmes, como a desempenhada pelo extrato enzimático de *M. heterothallica*, desestabiliza a estrutura do biofilme, promovendo sua dispersão. A ação de peptidases pode também degradar proteínas presentes na superfície das células, danificando-as e reduzindo a formação de biofilmes microbianos (de Menezes *et al.*, 2023; Molobela; Cloete; Beukes, 2010; Nahar *et al.*, 2018).

6. Conclusão

Neste trabalho, foi investigada a produção de peptidases pelo fungo *M. heterothallica* e a purificação de uma destas enzimas, cuja massa molecular foi estimada em 31 kDa. O estudo das propriedades funcionais das enzimas presentes no extrato fermentativo e pura evidenciou máxima atividade em pH alcalino, temperaturas entre 45-55°C e estabilidade em ampla faixa de pH. As enzimas presentes no extrato fermentativo e enzima pura demonstraram melhora considerável na atividade em presença do íon cobalto e redução da atividade pelos íons mercúrio e cobre (II). Em experimentos de aplicação do extrato enzimático sobre biofilmes microbianos, foi perceptível a elevada capacidade de dispersão da matriz extra polissacarídica tanto de *C. albicans* (remoção de 72%) quanto de *S. aureus* (remoção entre 53-58%).

REFERÊNCIAS

- AL-FATTANI, M. A.; DOUGLAS, L. J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: Chemical composition and role in drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, [s. l.], v. 55, n. 8, p. 999–1008, 2006.
- ATALAH, J. *et al.* Thermophiles and the applications of their enzymes as new biocatalysts. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 280, n. January 2019, p. 478–488, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.008>.
- BAIDAMSHINA, D. R. *et al.* Targeting microbial biofilms using Ficin, a nonspecific plant protease. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. April, p. 1–12, 2017.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- CHE HUSSIAN, C. H. A.; LEONG, W. Y. Thermostable enzyme research advances: a bibliometric analysis. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 37, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s43141-023-00494-w>.
- COUTO, M. T. T. *et al.* Production, extraction and characterization of a serine protease with fibrinolytic, fibrinogenolytic and thrombolytic activity obtained by *Paenibacillus graminis*. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 118, n. May, p. 335–345, 2022.
- COWAN, D. A. Thermophilic proteins: Stability and function in aqueous and organic solvents. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, [s. l.], v. 118, n. 3, p. 429–438, 1997.
- SILVA, R. R. *et al.* Biochemical Properties and Catalytic Specificity of a Novel Neutral Serine Peptidase Secreted by Fungus *Pyrenochaetopsis* sp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s. l.], v. 187, n. 4, p. 1158–1172, 2019.
- DE MENEZES, C. L. A. *et al.* The degradation of chicken feathers by *Ochrobactrum* intermedium results in antioxidant and metal chelating hydrolysates and proteolytic enzymes for staphylococcal biofilm dispersion. **3 Biotech**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 1–9, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03619-7>.
- DE SOUZA, P. M. *et al.* A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 337–346, 2015.
- DEETH, H. C. Heat-induced inactivation of enzymes in milk and dairy products. A review. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 121, p. 105104, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105104>.
- DI CERA, E. Serine proteases. **IUBMB Life**, [s. l.], v. 61, n. 5, p. 510–515, 2009.
- DUFFECK, C. E. *et al.* Keratinases from *Corioliopsis byrsina* as an alternative for feather degradation: applications for cloth cleaning based on commercial detergent compatibility and for the production of collagen hydrolysate. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 42, n. 11, p. 2403–2412, 2020.
- DUNN, B. M. Determination of protease mechanism. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: a practical approach**. Great Britain: IRL Press, 1989, p. 57– 81.

- ELLEUCHE, S. *et al.* Exploration of extremophiles for high temperature biotechnological processes. **Current Opinion in Microbiology**, [s. l.], v. 25, p. 113–119, 2015.
- FAZENDA, M. L. *et al.* Submerged Culture Fermentation of “Higher Fungi”: The Macrofungi. **Advances in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 63, n. 07, p. 33–103, 2008.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z.. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.
- GOMES, E. *et al.* Applications and Benefits of Thermophilic Microorganisms and Their Enzymes for Industrial Biotechnology. In: SCHMOLL, M.; DATTENBÖCK, C. (Eds.). **Gene Expression Systems in Fungi: Advancements and Applications**. [s. l.] Springer Cham, 2016. p. 459–492.
- GOMES, Eleni *et al.* Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.
- GOPINATH, S. C. B. *et al.* Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2017, 2017.
- GRZONKA, Z. *et al.* Structural studies of cysteine proteases and their inhibitors. **Acta Biochimica Polonica**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 1–20, 2001.
- GUPTA, R.; BEG, Q.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.
- GURUMALLESH, P. *et al.* A systematic reconsideration on proteases. **International Journal of Biological Macromolecules**, [s. l.], v. 128, p. 254–267, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.081>.
- HAJJI, M. *et al.* Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 791–797, 2007.
- HANSEN, G. H. *et al.* Production of cellulolytic enzymes from ascomycetes: Comparison of solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 50, n. 9, p. 1327–1341, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.017>.
- KONDO, M. Y. *et al.* Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 285, n. 28, p. 21437–21445, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.122432>.
- KUMARI, A. *et al.* Isolation and immobilization of alkaline protease on mesoporous silica and mesoporous ZSM-5 zeolite materials for improved catalytic properties. **Biochemistry and Biophysics Reports**, [s. l.], v. 2, p. 108–114, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2015.05.009>.
- LAEMMLI, U K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature Publishing Group**, [s. l.], v. 227, p. 680–685, 1970. Disponível em: <http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chnge-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certain-antibiotics/>.
- LAXMAN, R. Y. *et al.* **Process For The Preparation Of Alkaline Protease**. Depositante: Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi (IN), US n. 6,777,219-B2. Depósito:

13 de Mar de 2002. Concessão: 17 de Ago de 2004.

LI, A. N. *et al.* Cloning, expression, and characterization of serine protease from thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* var. *levisporus*. **Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 121–129, 2011.

LI, A. N. *et al.* Purification and Characterization of Two Thermostable Proteases from the Thermophilic Fungus *Chaetium thermophilum*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 624–631, 2007.

LI, D. C.; YANG, Y. I. J.; SHEN, C. Y. Protease production by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. **Mycological Research**, [s. l.], v. 101, n. 1, p. 18–22, 1997.

MAHBUB, K. R. *et al.* Mercury Inhibits Soil Enzyme Activity in a Lower Concentration than the Guideline Value. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 76–82, 2016.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. Thermophilic Fungi: Their Physiology and Enzymes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 64, n. 3, p. 461–488, 2000.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. *et al.* Aspartil-proteasas secretadas por hongos: revisión. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 76–82, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.riam.2015.10.003>.

MCDONALD, J. K. An overview of protease specificity and catalytic mechanisms: aspects related to nomenclature and classification. **The Histochemical Journal**, [s. l.], v. 17, n. 7, p. 773–785, 1985.

MEHTA, V. J.; THUMAR, J. T.; SINGH, S. P. Production of alkaline protease from an alkaliphilic actinomycete. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 97, n. 14, p. 1650–1654, 2006.

MERHEB, C. W. *et al.* Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 104, n. 1, p. 127–131, 2007.

MOLOBELA, I P.; CLOETE, T E.; BEUKES, M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. **African Journal of Microbiology Research**, [s. l.], v. 4, n. 14, p. 1515–1524, 2010. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/ajmr>.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, [s. l.], v. 362, n. November 2019, p. 141–154, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.026>.

MÓTYÁN, J.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J. Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology. **Biomolecules**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 923–942, 2013.

NAHAR, S. *et al.* Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 17, n. 6, p. 1484–1502, 2018.

OLIVEIRA, T. B. D.; RODRIGUES, A. Ecology of Thermophilic Fungi. **Fungi in Extreme Environments: Ecological Role and Biotechnological Significance**, [s. l.], 2019.

OZTAS GULMUS, E.; GORMEZ, A. Characterization and biotechnological application of protease from thermophilic *Thermomonas haemolytica*. **Archives of Microbiology**, [s. l.], v.

202, n. 1, p. 153–159, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01728-7>.

PEÑA-MONTES, C. *et al.* Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 78, n. 4, p. 603–612, 2008.

PROTEASE Market Size & Share Analysis - Growth Trends & Forecasts (2024 - 2029). **Mordor Intelligence**, 2024. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/proteases-market>. Acesso em 21 de jan de 2024.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [s. l.], v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC98927/pdf/mr000597.pdf>.

RAWLINGS, N. D. *et al.* MEROPS: The database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. D1, p. 503–509, 2014.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Introduction: Aspartic and Glutamic Peptidases and Their Clans. In: HANDBOOK OF PROTEOLYTIC ENZYMES. [S. l.: s. n.], 2013. v. 1, p. 3–19.

RAZZAQ, A. *et al.* Microbial proteases applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. JUN, p. 1–20, 2019.

ROBERT, C.; CADET, F.. Thermal Denaturation of an Enzyme - Choice of a Model. **Biochemical Education**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 154–157, 1996.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, [s. l.], v. 59, p. 1–41, 2015.

SAGGU, S. K.; JHA, G.; MISHRA, P. C. Enzymatic degradation of biofilm by metalloprotease from microbacterium sp. Sks10. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. AUG, 2019.

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 1–21, 2002.

SALAR, R. K. **Thermophilic Fungi - Basic Concepts and Biotechnological Applications**. [S. l.: s. n.], 2018-. ISSN 00755974.

SHARMA, S. *et al.* **Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00017-0>.

SARATH, G.; de la MOTTE, R. S.; WAGNER, F. W. Protease assay methods. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes a practical approach**. New York: Oxford University, 1996, p. 25-55.

SEE, Y. S.; JACKOWSKI, G. **Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis**. In: CREIGHTON, T. E. **Protein structure a practical approach**. New York: Oxford University, p. 1-19, 1989.

SILVA, R. R.. **Estudo comparativo das características bioquímicas funcionais e especificidade catalítica de aspartil, cisteíno e serino peptidases fúngicas**. 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2016.

SILVA, R. R. *et al.* Production and partial characterization of serine and metallo peptidases

secreted by *Aspergillus fumigatus* Fresenius in submerged and solid state fermentation. **Brazilian Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 235–243, 2013.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food and Science Technology** [s. l.], v. 43, n. 4, p. 573–583, 2010.

SINGHANIA, R. R. *et al.* Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 541–549, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.03.010>.

SUMANTHA, A.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: A perspective. **Food Technology and Biotechnology**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 211–220, 2006.

TSCHAN, S.; MORDMÜLLER, B.; KUN, J. F. J. Threonine peptidases as drug targets against malaria. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 365–378, 2011.

VAIDYANATHAN, S. *et al.* Monitoring of Submerged Bioprocesses. **Critical Reviews in Biotechnology** [s. l.], v. 19, n. 4, p. 277–316, 1999.

VAN DEN BRINK, J. *et al.* Phylogeny of the industrial relevant, thermophilic genera *Myceliophthora* and *Corynascus*. **Fungal Diversity**, [s. l.], v. 52, p. 197–207, 2012.

WARD, O. P. Proteases. **Comprehensive Biotechnology**, [s. l.], p. 571–572, 2011.

WARD, O. P.; RAO, M. B.; KULKARNI, A. Proteases, Production. **Encyclopedia of Microbiology**, [s. l.], p. 495–511, 2009.

YADAV, S. K. *et al.* Purification, biochemical characterization and performance evaluation of an alkaline serine protease from *Aspergillus flavus* MTCC 9952 mutant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 667–677, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2015.08.007>.

YANG, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 144, n. 1, p. 12–22, 2009.

YANG, Z. *et al.* Hofmeister effects on activity and stability of alkaline phosphatase. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, [s. l.], v. 1804, n. 4, p. 821–828, 2010.

YIN, W. *et al.* Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 14, 2019.

ZANPHORLIN, L. M. **Caracterização bioquímica de uma serino-protease produzida pelo fungo termofílico *Myceliophthora* sp.** 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista (UNESP), São José do Rio Preto, 2010.

ZANPHORLIN, L. M. *et al.* Production, partial characterization, and immobilization in alginate beads of an alkaline protease from a new thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Journal of Microbiology**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 331–336, 2010.

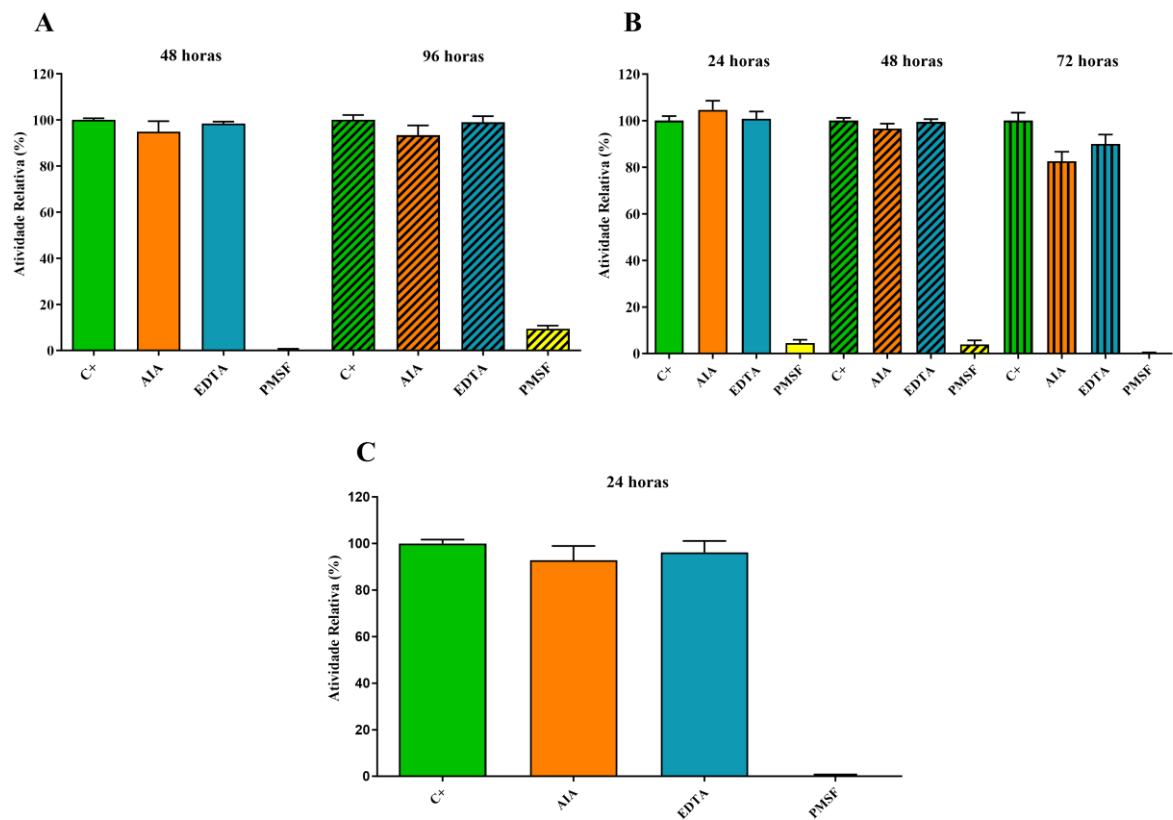
ZANPHORLIN, L. M. *et al.* Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, [s. l.], v. 46, n. 11, p. 2137–2143, 2011. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.08.014>.

ZERVA, A.; CHRISTAKOPOULOS, P.; TOPAKAS, E. Characterization and application of a novel class II thermophilic peroxidase from *Myceliophthora thermophila* in biosynthesis of polycatechol. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 75–76, p. 49–56, 2015.

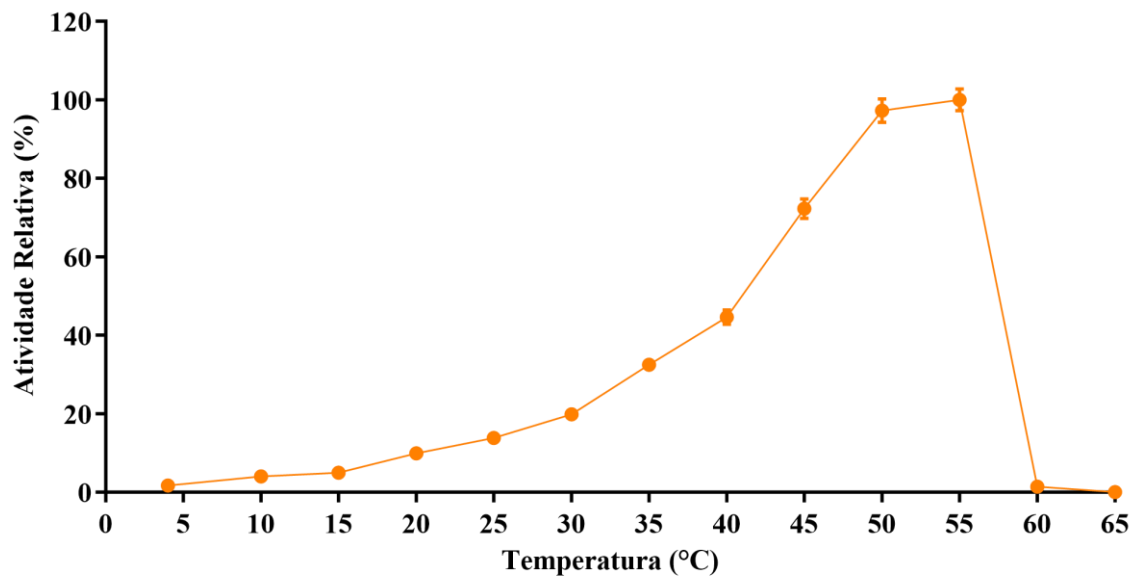
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.04.012>.

APÊNDICE A - Efeito de inibidores na atividade das peptidases presentes nos extratos das fermentações coletadas em diferentes tempos (horas). **A** – Cultivo suplementado com 0,5% de caseína; **B** – cultivo suplementado com 1% de caseína; **C** – cultivo sem suplementação por caseína



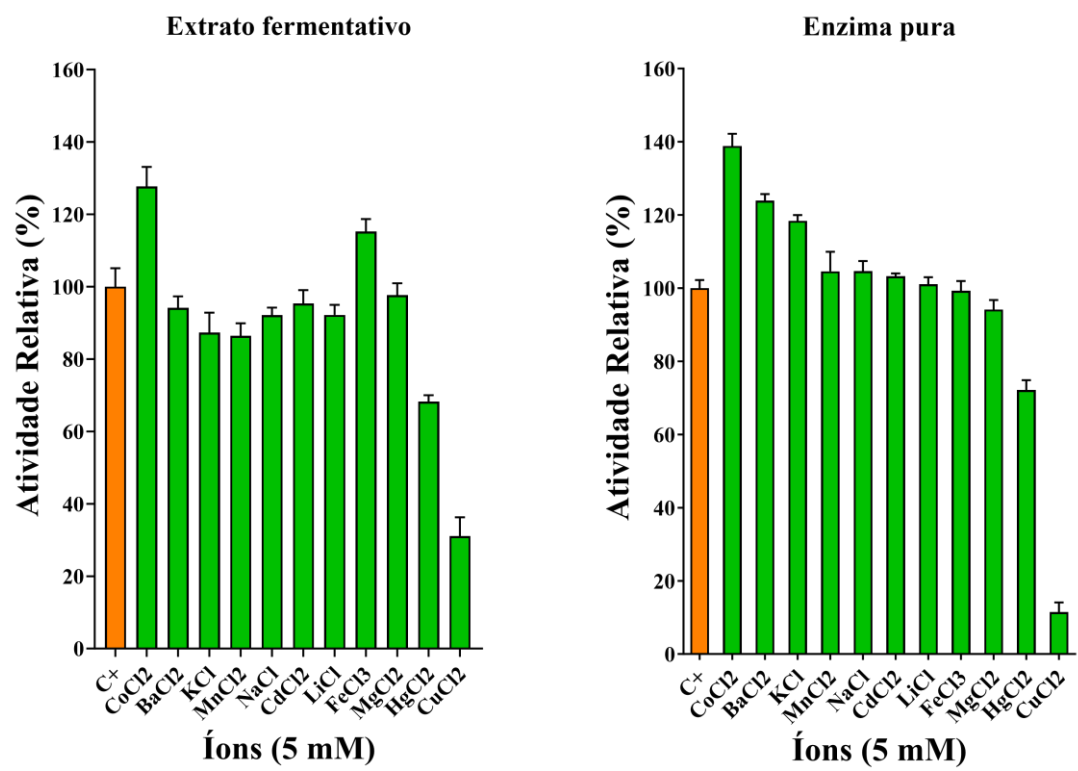
Fonte: Autoria própria (2024)

APÊNDICE B - Efeito da temperatura na atividade de peptidases presentes no extrato fermentativo do cultivo de *M. heterothallica*



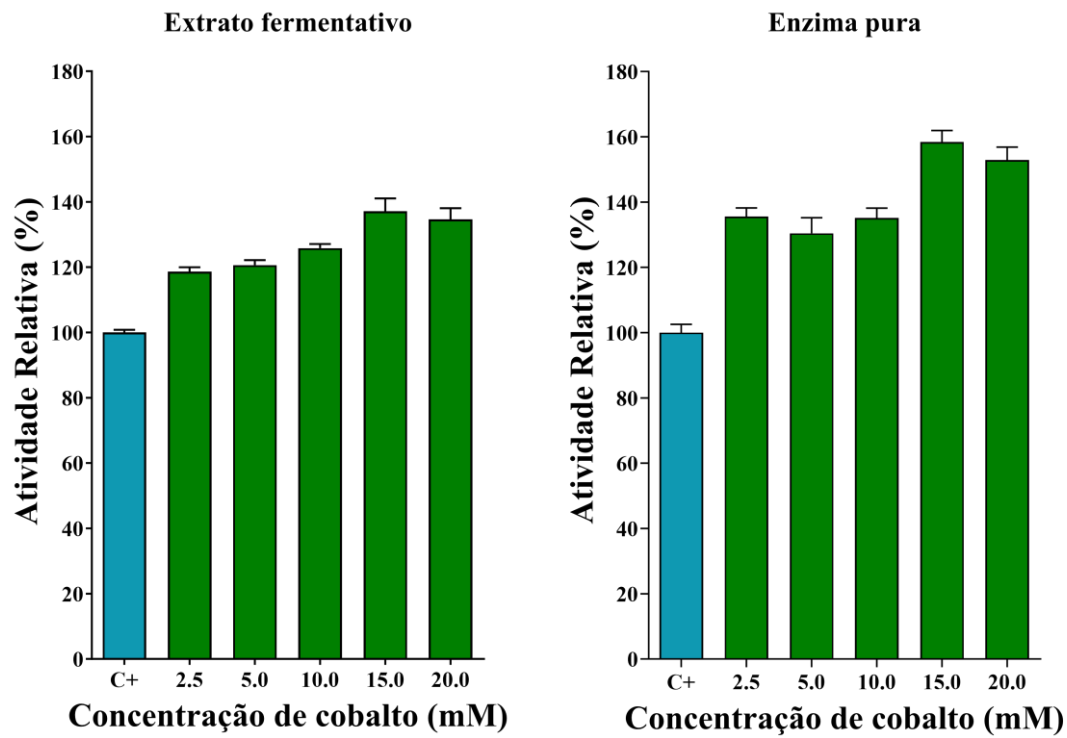
Fonte: Autoria própria (2024)

APÊNDICE C - Gráficos ilustrativos da influência de íons (5 mM) na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura



Fonte: Autoria própria (2024)

APÊNDICE D - Gráficos ilustrativos sobre a influência do íon cobalto na atividade enzimática do extrato fermentativo e da enzima pura



Fonte: Autoria própria (2024)