

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/02/2026.



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

ABREVIATÖES 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).

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>.