

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da  
peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.**

Gabriel Tescarolo Giovanini

Ribeirão Preto

2014

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da  
peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para  
obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e  
Sintéticos

**Orientado:** Gabriel Tescarolo Giovanini

**Orientador:** Prof. Dr. Hamilton Cabral

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 23/05/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Gabriel Tescarolo Giovanini

Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.

57 p., 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Cabral, Hamilton

1. Biotecnologia 2. Enzimologia 3. Liofilização

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gabriel Tescarolo Giovanini

Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Cabral

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## Resumo

**Giovanini, G. T.** Produção, liofilização, purificação e determinação de especificidade da peptidase isolada do fungo *Scopulariopsis koningii*. 2014. 57p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Peptidase pode ser considerada, como uma subclasse das enzimas hidrolíticas que ocupam uma posição central em relação às suas aplicações na área fisiológica e também na área comercial. As peptidases representam um dos três maiores grupos de enzimas industriais e são responsáveis por cerca de 60% da venda mundial de enzimas. O presente trabalho visa avaliar a produção de peptidase em fermentação submersa (FSm) pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, utilizando como substrato farinha de pena (FP), a caracterização bioquímica parcial, secagem do extrato bruto, purificação da peptidase e determinação de especificidade da peptidase isolada. Para avaliar a influência da farinha de pena (FP), na produção de peptidases, foram adicionadas às porcentagens de 0,2; 0,4 e 0,8% no meio de cultura. Os melhores níveis de produção de peptidases pelo fungo *Scopulariopsis koningii* foram obtidos nas concentrações de 0,4% e 0,8% de FP em 48h de fermentação com 1.427 U/mL. A caracterização bioquímica parcial do extrato bruto foi realizada com azocaseína 1% preparada em tampão com pH adequado. A peptidase presente no extrato enzimático apresentou atividade ótima em pH 6,5 e temperatura ótima de 55°C. A peptidase foi inibida por PMSF, indicando a presença de resíduo de aminoácido serino no sítio catalítico, e desta forma sendo classificada como serino peptidase. Entretanto, também observamos uma inibição por EDTA, sugerindo a presença de uma metalo peptidase presente no extrato bruto, desta forma podemos sugerir que o fungo *S. koningii* na presença do meio contendo FP secreta duas subclasses; serino e metalo peptidase, ou secreta uma serino peptidase dependente de íon. Zimograma constatou a presença de duas enzimas. A atividade enzimática do extrato bruto diminuiu significativamente quando exposta os íons  $Al^{+3}$ ,  $Ni^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  e aumentada quando adicionados os íons  $Ba^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ . A purificação da metalo peptidase presente no extrato enzimático envolveu sete etapas de purificação, sendo cromatografia de troca-iônica e gel filtração determinantes, com recuperação de 6% e purificação de 3,4 vezes. Utilizando a peptidase pura (metalo) realizou-se a caracterização bioquímica funcional e a determinação dos parâmetros cinéticos, ambos utilizando o substrato peptídico de supressão intramolecular de fluorescência. A peptidase pura apresentou atividade ótima em pH 6,0 e temperatura ótima de 40°C e mostrou-se estável em ampla faixa de pH e temperatura. Foi modulada positivamente pelos íons  $Na^{+}$  e  $K^{+}$  e negativamente por  $Al^{3+}$  e  $Cu^{2+}$ . A análise dos parâmetros cinéticos revelou uma grande influência de aminoácidos apolares do lado “linha” do substrato sintético na eficiência catalítica e no lado não “linha” grande influência de aminoácidos polares neutros e apolares. A secagem foi realizada por liofilização foram utilizados três tipos de adjuvantes: maltodextrina, manitol e glicina, em diferentes concentrações. Após a secagem foi realizado estudo da estabilidade nas temperaturas 4, 25 e 60°C por 32 dias para avaliar o desempenho dos adjuvantes na manutenção da atividade do extrato enzimático liofilizado. O adjuvante considerado mais eficaz foi a maltodextrina na concentração de 4,5% que manteve cerca de 93% da atividade do extrato enzimático liofilizado por 32 dias.

Palavras-chave: biotecnologia, enzimologia, liofilização, peptidase, bioprocessos.

### Abstract

**Giovanini, G. T.** Production, freeze drying, purification and determination of specific peptidase isolated from the fungus *Scopulariopsis koningii*. 2014. 57p. Thesis (Master). Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Peptidase can be considered as a subclass of hydrolytic enzymes which occupy a central position in relation to their applications in physiological area and also in the commercial area. Peptidases represent one of the three largest groups of industrial enzymes and account for about 60% of worldwide sales of enzymes. This study aims to evaluate the production of peptidase in submerged fermentation (FSm) by the fungus *Scopulariopsis koningii*, using as substrate feather meal (FP), the partial biochemical characterization, drying the crude extract, purification and determination of specific peptidase isolated. To evaluate the influence of feather meal (FM), in the production of peptidases, were added to the percentages of 0.2, 0.4 and 0.8% in the culture medium. The best levels of production of peptidases by the fungus *Scopulariopsis koningii* were obtained at concentrations of 0.4% and 0.8% of FP 48h fermentation with 1,427 U/mL. Partial biochemical characterization of the crude extract was performed with 1% azocasein prepared in buffer with appropriate pH. This in peptidase enzyme extract showed optimal activity at pH 6.5 and optimum temperature of 55°C. The peptidase was inhibited by PMSF, indicating the presence of a serine residue at amino acid catalytic site, and thus being classified as serine peptidase. However, we also observed an inhibition by EDTA, suggesting the presence of a metallo peptidase present in the crude extract, thus we suggest that the fungus *S. koningii* in the presence of medium containing secret FP two subclasses; serine peptidase and metal, or secretes a serine peptidase dependent ion. Zymogram found the presence of two enzymes. The enzymatic activity of the crude extract decreased significantly when exposed the  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  ions and increased when added to  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  ions. The purification of metallo peptidase present in the enzyme extract involved seven stages of purification, and ion-exchange chromatography and gel filtration determinants, with recovery and purification of 6 % from 3.4 times. Using pure peptidase (metallo) held functional biochemical characterization and determination of kinetic parameters using both the intramolecular peptide substrate fluorescence suppression. Pure peptidase showed optimal activity at pH 6.0 and optimum temperature of 40°C and was stable in a wide range of pH and temperature. The positively modulated by  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  and negatively by  $\text{Al}^{3+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . Analysis of kinetic parameters revealed a strong influence of nonpolar amino acid side “line” of the synthetic substrate in the catalytic efficiency and not on the side “line” great influence of nonpolar and polar neutral amino acids. The freeze drying was performed by three types of additives were used: maltodextrin, mannitol and glycine in different concentrations. After drying stability study was conducted at the temperatures 4, 25 and 60°C for 32 days to evaluate the performance of additives in maintaining the activity of the enzyme extract lyophilized. The adjuvant was found more efficacious maltodextrin in a concentration of 4.5%, which retained about 93% of the extract lyophilized enzyme activity for 32 days.

Keywords : biotechnology, enzymology , lyophilization , peptidase , bioprocesses .

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Enzimas

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadoras de reações químicas, sendo essenciais para o sistema metabólico de todos os organismos vivos e possuem um papel fundamental na degradação da matéria orgânica, na infecção do hospedeiro e deterioração dos alimentos (LEHNINGER et al., 1995).

Podem ser divididas em seis classes, segundo as reações que catalisam: oxidorredutases (catalisam reações de oxidoreduções); transferases (catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra); hidrolases (catalisam reações de hidrólise); liases (catalisam reações de quebra de ligações); isomerasas (catalisam reações de mudança intramolecular, onde um substrato transforma-se em um produto isômero) e ligases (catalisam a ligação covalente de moléculas, com simultânea quebra de uma ligação de alta energia) (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

Enzimas possuem estrutura molecular complexa, constituída principalmente por uma parte proteica que pode estar integrada a outras moléculas, como carboidratos e lipídeos (HARTMEIER, 1988). Esses heteropolímeros são formados por aminoácidos ligados covalentemente por ligações peptídicas. A estrutura primária das enzimas corresponde à sequência de seus aminoácidos; sua estrutura secundária corresponde à interação desses aminoácidos com aminoácidos adjacentes, formando arranjos espaciais do tipo  $\alpha$ -hélice ou folha  $\beta$ . A estrutura terciária corresponde às interações entre aminoácidos não sequencialmente próximos, o que promove torções e dobramentos; esta estrutura configura o sítio catalítico da enzima, o que é determinante para sua atividade biológica. Já a estrutura quaternária das enzimas corresponde à interação entre cadeias polipeptídicas (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

As enzimas são utilizadas na biologia molecular e na biomedicina (EL TAYAR et al., 1991), no desenvolvimento de metodologias analíticas, na fabricação de produtos tecnológicos e no tratamento de resíduos (ITOH et al., 1990). São bastante ativas e versáteis, não requerem altas temperaturas e valores extremos de pH e executam uma variedade de transformações de modo seletivo e rápido em condições brandas de reação, o que torna altamente desejável o seu uso como catalisadores. Geralmente, os processos industriais que empregam enzimas são relativamente simples, fáceis de controlar, eficientes energeticamente e requerem investimentos de baixo custo (DZIEZAK, 1991; PATEL, 2002; PIZARRO e PARK, 2003; COLLEN, 2006).

A produção de enzimas é uma área da Biotecnologia em expansão, que movimenta bilhões de dólares anualmente (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Novas enzimas e usos estão sendo descobertas a partir do trabalho conjunto de equipes multidisciplinares da Microbiologia, Bioquímica, Química, Engenharia Bioquímica, entre outras áreas, complementando os conhecimentos que cada área possui sobre as enzimas. E são decrescentes os custos das enzimas industriais; assim, a utilização de enzimas tende a aumentar continuamente (SANT'ANNA JUNIOR, 2001).

## **1.2. Peptidases**

Enzimas proteolíticas, proteases, proteinases ou peptidases são formas utilizadas, porém este último termo é o recomendado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). Essas enzimas catalisam a quebra das ligações peptídicas de proteínas e são largamente distribuídas em todas as plantas, animais e micro-organismos. Em organismos superiores, cerca de 2% dos genes codificam essas enzimas (MAHAJAN e BADGUJAR, 2010).

A clivagem de ligações peptídicas é uma das mais frequentes e importantes modificações que ocorrem em proteínas. Historicamente, a proteólise enzimática foi associada com a digestão de proteínas e chamou a atenção de fisiologistas e bioquímicos, interessados neste processo em animais, inclusive no homem. Assim, as peptidases digestivas que constituem as secreções gástricas e pancreáticas são as enzimas mais bem caracterizadas, gerando o conhecimento atual sobre as estruturas e funções das enzimas proteolíticas em geral.

Investigações das propriedades cinéticas, especificidade e inibição, associadas com análises detalhadas de suas estruturas por cristalografia de raios x e de suas sequências de aminoácidos, levaram à identificação dos componentes e da geometria dos sítios ativos de peptidases, permitindo a dedução de seus mecanismos de ação. Como resultado, tornou-se evidente que as peptidases podem ser classificadas em famílias e que membros de uma mesma família apresentam estruturas e mecanismos de ação similares (NEURATH, 1990).

Importantes, também, no campo comercial, além do fisiológico, as peptidases representam 60 % do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, nas áreas de alimentação e de detergentes (GODFREY e WEST, 1996).

As peptidases são classificadas como subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases,



dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando ligações peptídicas nas extremidades N ou C terminal e no interior da molécula, respectivamente (VERMELHO et al., 2008; THYS, 2004; MENDONÇA, 2008; GIONGO, 2006).

Muitas classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, sendo quatro classes consideradas mais comuns: serino, cisteíno, aspártico e metalo peptidases. (RAWLINGS E BARRETT, 1993). As serino peptidases incluem duas famílias distintas: as serino peptidases de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastase) e a peptidase bacteriana subtilisina. Diferem entre si na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, embora tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum. Analogamente, as metalo peptidases incluem duas famílias: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos e a termolisina bacteriana, que diferem uma da outra na estrutura química, embora ambas tenham zinco em seu sítio ativo (KRAUT, 1977).

A família de peptidase mais bem caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino peptidases, exemplificada pelas enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína. A marca de seus sítios ativos é a tríade catalítica asparagina (Asp), histidina (His) e serina (Ser). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977). A conformação global das serino peptidases é praticamente a mesma: dois domínios compactos, simetricamente dispostos ao redor de dois eixos de simetria. Diferenças na especificidade do substrato podem estar relacionadas à substituição de aminoácidos no sítio primário do substrato, comumente denominado de P1, e a diferenças menores, no sítio secundário (CRAIK et al., 1982).

As cisteíno peptidases incluem várias catépsinas de mamíferos, as peptidases ativadas pelo cálcio citossólico (calpaínas) e a papaína e a actinidina de plantas, sendo as papaínas as mais estudadas dessa família. O principal resíduo de aminoácido catalítico é a cisteína (Cys). A catálise ocorre via um éster tiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico (BODE e HUBER, 1992).

As peptidases aspárticas incluem a penicilopepsina bacteriana (que serve como um modelo), a pepsina de mamíferos, a renina, a quimosina e certas peptidases fúngicas. O resíduo ativo característico é o ácido aspártico (NEURATH, 1990).

As metalo peptidases, carboxipeptidases A e B são exopeptidases homólogas, em estrutura e sítio ativo. A carboxipeptidase A prefere o carbono aromático terminal e cadeias alifáticas de natureza hidrofóbica, enquanto a carboxipeptidase B atua diretamente sobre os resíduos básicos de arginina e lisina. A carboxipeptidase A é uma das mais investigadas quanto à cinética, métodos espectroscópicos e cristalográficos de análise. O sítio ativo inclui

zinco, o qual é ligado a dois ácidos glutâmicos e a uma histidina. A termotilisina bacteriana é a única representante das metalo endopeptidases de estrutura e mecanismo de ação bem definidos. Seu sítio ativo é relacionado àquele das metalo carboxipeptidases (NEURATH, 1990).

As peptidases provenientes de microrganismos são preferidas em relação àquelas de plantas e de animais, do ponto de vista científico e comercial, por ser fonte de rápido crescimento, requerer espaço limitado para cultivo, além de ser de fácil manipulação genética (WARD, 1983).

Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* é o mais estudado quanto à produção de peptidases, especialmente a subtilisina de *B. subtilis*. Quanto aos vírus, estes expressam serino, cisteíno e peptidases aspárticas, cuja importância funcional é o envolvimento no processamento de proteínas da cápsula viral, as quais podem estar relacionadas ao câncer e à Aids (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

Os fungos são, de maneira geral, capazes de produzir a maior variedade de peptidases entre os microrganismos. Entre os fitopatogênicos, muitos produzem peptidases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA e MOSOLOV, 2004). A primeira peptidase extracelular obtida de um fitopatógeno, em sua forma pura, foi uma de 25 KDa, isolada de *Colletotrichum lindemuthianum*, em 1973 (RIES e ALBERSHEIM, 1973).

### **1.3. Funções fisiológicas das peptidases**

As peptidases participam de diversos mecanismos fisiológicos, dentre eles o processo de inflamação, catabolismo de proteínas, coagulação do sangue, crescimento de tumores e metástases, transporte e secreção de proteínas na membrana celular. São também responsáveis por um mecanismo complexo que envolve a fisiologia normal das células e as condições patológicas anormais. Isto faz com que peptidases sejam alvos para desenvolvimento de agentes terapêuticos para algumas doenças como a AIDS, ou ainda serem utilizadas em indústrias alimentícias e de detergentes (THYS, 2004).

Sua importância em conduzir o metabolismo essencial e as funções regulatórias é visível em todos os organismos vivos. De maneira geral as peptidases extracelulares catalisam a hidrólise de proteínas em moléculas menores para permitir absorção das células e as peptidases intracelulares possuem papel vital na regulação do metabolismo (RAO et al., 1998; MENDONÇA, 2008).

#### 1.4. Aplicações biotecnológicas de peptidases

As aplicações das peptidases no mercado industrial mundial estão ligadas à Biotecnologia, um conjunto de áreas ligadas à ciência e tecnologia que envolve Microbiologia, Genética, Bioquímica e Engenharia Química. Essas aplicações visam o uso de novas matérias-primas e a melhoria de processos e das características físico-químicas de matérias-primas e produtos. Portanto, do ponto de vista industrial, uma enzima comercialmente utilizável é aquela que garante a obtenção de um produto final de melhor qualidade que o produto tradicional; a melhoria do processo de produção, reduzindo custos laboratoriais (ABRAHÃO NETO, 2001).

No segmento têxtil, as peptidases são utilizadas durante o processamento de couros. São aplicadas na fase inicial de limpeza e remoção dos pêlos; já nas fases finais, elas degradam parcialmente a queratina e a elastina presentes no couro (ABRAHÃO NETO, 2001; WISEMAN, 1985).

Peptidases são utilizadas em todos os tipos de detergentes, sejam eles líquidos ou sabões em pó utilizados em máquinas automáticas de lavagem, e sua função é a degradação de compostos, como sangue, manchas de ovos, leite e etc. (MAURER, 2004).

Já na indústria farmacêutica, as peptidases são utilizadas com o objetivo de facilitar/dificultar as reações bioquímicas da pele, proteger/reparar a pele, destruir/remover parcial ou totalmente algumas estruturas da pele. Na enzimocosmética direta, as enzimas são responsáveis pela proteção da pele contra agentes externos, promoção de *peeling* biológico, limpeza profunda e facilitação da penetração de substâncias ativas (SIM et al., 2003).

Na indústria de alimentos, por exemplo, na produção de laticínios, peptidases têm sido empregadas para reduzir o tempo global da cura do queijo, já que este tempo representa um alto percentual dos custos de produção (VITOLLO, 2001).

A tabela 1 exemplifica algumas fontes de peptidases e suas possíveis aplicações industriais.

Tabela 1: Fontes de obtenção de peptidases e aplicações industriais

| Fonte de obtenção  | Enzima                        | Aplicação Industrial   |
|--|-------------------------------|--|
| Animal   | Tripsina,<br>Quimotripsina    | Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas e síntese de peptídeos. |
| Vegetal  | Papaína, Ficina,<br>Bromelina | Produção de extratos de leveduras, cerveja, panificação, fármacos, amaciamento de carne.                                   |
| <i>Apergillus niger</i>  | Peptidases ácidas e neutras   | Queijo, carnes, pescado, cereais e bebidas.  |
| <i>Aspergillus oryzae</i>  | Peptidases ácidas e neutras   | Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e panificação.                                  |
| <i>Aspergillus melleus</i> ,<br><i>Endothia parasítica</i> ,<br><i>Mucor miehei</i> e<br><i>Mucor pusillus</i> | Peptidases alcalinas          | Manufatura de queijo (coagulação de leite).  |
| <i>Bacillus licheniformia</i> e<br><i>Bacillus subtilis</i>  | Peptidases alcalinas          | Fabricação de detergentes e indústria do couro, processamento de carnes, pescados e produtos lácteos.                      |
| <i>Bacillus subtilis</i> e<br><i>Bacillus cereus</i>   | Peptidase neutra              | Produção de bebidas e panificação.   |

Fonte: extraído e modificado de Wiseman, 1991.

### 1.5. Bioprocesso submerso

A fermentação submersa é definida como um processo fermentativo com excesso de água, sendo o sistema mais empregado industrialmente para a obtenção de uma variedade de importantes metabólitos produzidos por fungos filamentosos (GIBBS et al., 2000). São normalmente utilizados em escala laboratorial devido a sua facilidade de manuseio e controle de parâmetros de bioprocessos (NIGAM, 2009), além de fácil recuperação do micélio, dos esporos extracelulares e das enzimas produzidas. Entretanto, uma vez diluídos, produtos e extratos enzimáticos podem tornar-se menos estáveis que aqueles utilizados na fermentação sólida. O bioprocessos submerso e em estado sólido tem sido amplamente utilizado como meios de obtenção de peptidases. (GIONGO, 2006).

A produção de enzimas em escala industrial é realizada por processo fermentativo submerso devido a este possuir relativa facilidade de cultivo, garantir homogeneidade do meio e facilidade de parâmetros de controle de processo, entretanto possui a desvantagem de maior facilidade de contaminação devido à alta atividade de água e conseqüente possibilidade de desenvolvimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos (LIMA et al., 2001).

#### 1.6. *Scopulariopsis koningii* (Oudem.) Vuill. 1911



**Figura 1.** *Scopulariopsis sp.* Extraído de Atlas Micologia, data de acesso dez. 2013.

*Scopulariopsis* spp. é um fungo filamentosos que habita solo, material vegetal, penas, e insetos. É distribuído em todo o mundo. Várias espécies do gênero *Scopulariopsis* têm pleomorfismo e estão também classificados no gênero *Microascus* (MARCHISIO, 2000).

O gênero *Scopulariopsis* é normalmente considerado patogênico, que pode provocar infecções em seres humanos, especialmente em pacientes imunossuprimidos (BALLESTÉ et al. 2003).

O gênero *Scopulariopsis* é único que contém ambos moniliaceous (hialina) e dematiaceous espécies, com várias existências clinicamente significativas. A espécie mais comum é *S. brevicaulis*, um molde hialino. Outras espécies não pigmentadas incluem *S. cândida*, *S. koningii*, *S. Acremonium*, e *S. Flava* que se mantém as colônias brancas na maturidade (ARAÚJO et al. 2003).

Macroscopicamente as colônias do gênero *Scopulariopsis* crescem moderadamente rápidas e maduram dentro de cinco dias. A cor é branca e tornam-se inicialmente castanho claro ou amarelo-claro. Algumas espécies podem formar colônias castanhas mais escuras (CAVALLERA e ASBATI 2006).

Microscopicamente, as características são hifas septadas, conidióforos, anelídios, e conídios também podem ser vistos. Clamidosporas ocasionalmente podem estar presentes.

Conidióforos são semelhantes a hifas simples ou ramificados. Conídios são globosos, piriformes, porém, mais comumente aproximada de paredes, espinhosos, truncados e formando cadeias basipetal (CAVALLERA e ASBATI 2006).

### **1.7. Liofilização**

A estabilização de estruturas proteicas é sempre uma questão importante a ser levantada, independente do âmbito em que o assunto é envolvido. Isso se deve ao fato de estruturas proteicas estarem susceptíveis a diversos tipos de alterações químicas e físicas, tais como deaminações, proteólise, oxidação, agregação, mudanças conformacionais irreversíveis, inibição química por ligantes, etc (UNITED States Pharmacopeia, 2005).

A liofilização é o método mais comumente utilizado para a preparação de proteínas desidratadas, as quais, teoricamente, devem apresentar uma estabilidade adequada por um longo período de armazenagem em temperatura ambiente. A liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação, utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A liofilização é o método de primeira escolha para produtos termolábeis. Entretanto, estudos recentes com espectroscopia por infravermelho têm documentado que os problemas relacionados com o congelamento e a desidratação induzidos pela liofilização podem levar ao desdobramento molecular da proteína. O desdobramento não somente pode levar à desnaturação irreversível da proteína, mesmo se a amostra é reidratada imediatamente, mas também pode reduzir a estabilidade durante o armazenamento da proteína liofilizada (CARPENTER et. al., 1999).

Além do mais, a simples obtenção de uma proteína com conformação estrutural nativa em amostras reidratadas imediatamente após a liofilização não é necessariamente indicativo de estabilização adequada durante a liofilização ou armazenamento. Muitas proteínas apresentam desdobramento estrutural durante a liofilização, mas logo são restauradas se hidratadas imediatamente (CARPENTER et. al., 1999).

As proteínas raramente podem ser liofilizadas sem perda da atividade, geralmente associadas às alterações em sua conformação. Portanto, um agente estabilizante, por exemplo, um açúcar ou um poli-álcool, normalmente é exigido. A adição de um estabilizador, normalmente em uma concentração muito mais alta que a da própria proteína, resulta em uma transição vítrea predominantemente observada durante o resfriamento ou desidratação (WANG, 2000).

O processo de liofilização remove a água de um sistema, baseado no princípio da sublimação do gelo em pressões reduzidas. Quando uma solução proteica é liofilizada, o volume de água que reside nas matrizes de gelo da solução congelada sublima primeiro. As multicamadas da água que envolve a molécula de proteína são removidas, deixando uma monocamada residual de água na superfície da proteína. Esta operação permite a secagem dos materiais termolábeis para diminuir o conteúdo de umidade residual sob moderadas condições de temperatura. O conteúdo de água do material liofilizado no recipiente final pode variar dependendo dos parâmetros da liofilização e pode aumentar durante o armazenamento (TOWNS, 1995).

A quantidade de água presente na proteína tem um significativo impacto na estabilidade e é uma preocupação tanto para o volume do sólido como para as formulações liofilizadas. A umidade residual refere-se ao baixo nível da água da superfície, variando desde menos de 1% até 5%, permanecendo em um produto biológico liofilizado após a remoção do volume do solvente. A umidade residual não deve comprometer a potência e integridade do produto. O nível apropriado de umidade residual para otimizar a estabilidade de uma proteína liofilizada é muito dependente dos caminhos específicos para a decomposição da mesma. Porém, os níveis de umidade residual de certos produtos não deveriam ser tão baixos a ponto do excesso de secagem afetar adversamente a estabilidade do produto. A retenção de água varia de acordo com tipo de ligação, superfície e/ou água retida, e é diferente para cada produto. (TOWNS, 1995).

## 5. CONCLUSÕES

As grandes inovações virão não apenas como consequência do desenvolvimento de novas enzimas, mas também, como resposta a ajustes na metodologia de uso das atuais enzimas, passando a ser obtidas a partir de outros microrganismos ou novos processos de cultivo dos mesmos.

É importante o aprimoramento das metodologias utilizadas para otimizar a produção de enzimas de interesse industrial para o processo se tornar o mais rentável possível e produzir quantidades significativas de peptidase. Para tal, o presente trabalho visou a produção de peptidase pelo fungo *Scopulariopsis koningii*, utilizando o substrato farinha de pena. O fungo possui potencial para secretar peptidases de interesse industrial, além de ser facilmente manipulável, de baixa esporulação e crescimento rápido em meio de cultura barato como PDA. Em relação ao substrato, além de economicamente viável, contém alto teor de proteínas em sua composição e foi capaz de estimular a produção de peptidase sem a necessidade de suplementação com outras fontes de nitrogênio e carbono.

O extrato enzimático obtido no bioprocessamento submerso apresentou como condições ótimas pH 6,5 e temperatura 55°C. O perfil de inibição sugere a presença de serino e metalo peptidases e os íons apresentaram capacidade de modular positiva e negativamente a atividade proteolítica do extrato enzimático concentrado.

A purificação do extrato enzimático se mostra promissora, sendo que já foi estabelecido um protocolo para a purificação da metalo peptidase, e para a purificação da serino peptidase, a metodologia poderá ser desenvolvida em trabalhos futuros.

A metalo peptidase purificada foi caracterizada utilizando os substratos com supressão intramolecular de fluorescência, pois permitem o monitoramento da reação de forma contínua, proporcionando um método prático e rápido para a determinação da atividade enzimática. A enzima apresentou como condições ótimas pH 6,0 e temperatura 40°C e obteve boa estabilidade em ampla faixa de pH (5 a 9,5) e temperatura (25 a 45°C) mantendo cerca de 90% da atividade proteolítica. A peptidase foi modulada positivamente por íons monovalentes positivos ( $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ ) e modulada negativamente, principalmente, por íons divalentes positivos, como zinco e cobre. A inibição por EDTA e o inibidor específico de metalo peptidase, fosforomidon, corroborou com a hipótese da presença de uma metalo peptidase no extrato enzimático bruto obtido pelo bioprocessamento submerso. Dentre os surfactantes analisados, SDS proporcionou uma ativação de aproximadamente 30% na atividade proteolítica na



concentração de 0,005%, enquanto que na presença de CTBA a atividade residual foi cerca de 20%.

As enzimas proteolíticas têm um papel fundamental em muitos processos biológicos. Por isso, o estudo da especificidade das peptidases pode ser importante para uma melhor compreensão da função destas enzimas e para o desenvolvimento de inibidores. Para tal, o presente estudo utilizou os substratos com supressão intramolecular de fluorescência. Foram analisados os subsítios  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S'_3$ ,  $S'_2$  e  $S'_1$ . Aminoácidos com cadeias laterais apolares alifáticas e polares não carregados proporcionaram a maior eficiência catalítica da peptidase quando inseridos nas posições  $P_2$  e  $P'_3$  do substrato, respectivamente. A maior afinidade, ou seja, menor valor de  $K_M$ , foi obtida no subsítio  $S'_3$  na presença do aminoácido leucina na posição correspondente.

O processo de liofilização obteve rendimento aceitável e os resultados de estabilidade sugerem a possibilidade de acondicionamento do extrato enzimático em pó na temperatura de 25°C, porém, é necessário um estudo mais amplo em relação à estabilidade para concluir a meia vida do extrato, sendo possível, dessa forma, estabelecer um prazo de validade no caso de uma futura aplicação industrial.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO NETO, J. Algumas aplicações de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001 p.405-412.
- ANBU, P.; Gopinath, S.C.B.; Hilda, A.; Lakshmipriya, T.; Annadurai, G. Optimization of extracellular keratinase production by poultry farm isolate *Scopulariopsis brevicaulis*. **Bioresource Technology**, Inglaterra, v.98, p.1298-1303, 2007.
- ANITHA, T.S.; PALANIVELU, P. Production and characterization of keratinolytic protease(s) from the fungus *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Research in Biological Sciences**, v.2, n.2, p.87-93, 2012.
- ARAÚJO, A. J. G.; SOUZA, M. A. J.; BASTOS, O. M. P.; OLIVEIRA, J. C. Onicomiose por fungos emergentes: análise clínica, diagnóstico laboratorial e revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v.78, n.445-455, 2003.
- BALAJI, S.; SENTHIL, K. M.; KARTHIKEYAN, R.; KUMAR R.; KIRUBANANDAN, S.; SRIDHAR, R.; SEHGAL, P. K.. Purification and characterization of an extracellular keratinase from a hornmeal-degrading *Bacillus subtilis* MTCC (9102). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Netherlands, v.24, p.2741–2745, 2008.
- BALLESTÉ, R.; MOUSQUÉS, N.; GEZUELE, E. Onicomiosis. Revisión del tema. **Revista Médica de Uruguay**, v.19, p.93-106. 2003.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.204, n.2, p.433-451, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976.
- CARPENTER, J. F.; IZUTSU, K.; RANDOLPH, T. W. Freezing- and drying-induced perturbations of protein structure and mechanisms of protein protection by stabilizing additives, *Freezing-Drying / Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, edited by Louis Rey, 1999.

CARPENTER, J.; CROWE, J.H. An infrared spectroscopy study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. **Biochemistry**, New York, v.28, p.3916-3922, 1984.

CAVALLERA, E.; ASBATI, M. Onicomycosis por hongos filamentosos no dermatófitos. **Dermatol Venez**, v.44, p.4-10, 2006

CHAGAS, J. R.; JULIANO, L.; PRADO, E. S. Intramolecularly quenched fluorogenic tetrapeptide substrate for tissue and plasma kallikreins. **Analytical Biochemistry**, New York, v.192, n.2, p.419-425, 1991.

COLEN, G. **Isolamento e seleção de fungos filamentosos produtores de lipases**. 2006. 206 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

CRAIK, C. S.; SPRANG, S.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W. Intron-exon splice junctions map at protein surfaces. **Nature**, v.299, n.5879, p.180-182, 1982.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial**, Zaragoza Acribia, p.413, 1993.

DIENES, D.; BORJESSON, J.; HAGGLUND, P.; TJERNELD, F.; LIDEN, G.; RECZEY, K. Identification of a trypsin-like serine protease from *Trichoderma reesei* QM9414. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.40, p.1087-94, 2007.

DRUCKER, H. Regulation of exocellular peptidases in *Neurospora crassa*: metabolic requirements of the process. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.122, p.1117-1125, 1975.

DUCROS, E.; FERRARI, M.; PELLEGRINO, M.; RASPANTI, C.; BOGNI, C. Effect of aeration and agitation on the peptidase production by *Staphylococcus aureus* mutant RC128 in a stirred tank bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.32, p.143-148, 2009.

DUNAEVSKY, Y.E.; MATVEEVA, A.R.; BELIAKOVA, G.A.; DOMASH, V.I.; BELOZERSKY, M.A. Extracellular alkaline proteinase of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Biochemistry**, Moscow, v.72, p.345-50, 2007.

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.

DZIEZAK, J. D. Enzymes: catalyst for food processes. **Food Technology**, Chicago, v.45, n.1, p.78-85, jan. 1991.

EL TAYAR, N.; RUEY-SHIUAM, T.; TESSA, B.; CARUPT, P. A. Percutaneous of drugs: a quantitative structure-permeability relationship study. **Journal of Pharmaceutical Science**, Hoboken, v.80, n.8, p.744-749, ago. 1991.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M. C. Q. B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon**, Elmsford, v.36, p.1039-1051, 1998.

FERNANDES, B.L.; ANEAS, M.A.F.; JULIANO, L.; PALMA, M.S.; LEBRUN, I.; PORTARO, F.C.V. Development of an operational substrate for ZapA, a metalloprotease secreted by the bacterium *Proteus mirabilis*. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v.33, p.765–70, 2000.

GHORBEL, B.; KAMOUN, A.S.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.32, p.513-518, 2003.

GIBBS, P.A.; SEVIOUR, R.J.; SCHMID, F. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.20, n.1, p.17-48, 2000.

GIONGO, J.L. **Caracterização e aplicação de peptidases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** 95p. Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. RS. 2006.

GODFREY, T.; S.WEST. **Industrial enzymology**, 2. ed. New York: Macmillan Publishers Inc, 1996, p.609.

GRAHN, S.; KURTH, T.; ULLMANN, D.; JAKUBKE, H. S' subsite mapping of serine proteases based on fluorescence resonance energy transfer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Protein Structure and Molecular Enzymology**, Amsterdam, v.1431, p.329-337, 1999.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; KHAN, S.; CHAUHAN, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.60, p.381-395, 2002.

HARTMEIER, W. **Immobilized biocatalysts: an introduction**, Berlin: Springer Verlag, 1988.

HATANAKA, T.; UESUGI, J.A.Y.; IWABUCHI, M. Purification, characterization cloning, and sequencing of metalloendopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2. **Arch. Biochimica et Biophysica**, Amsterdam, v.434, p.289–298, 2005.

ILLANES, A.; WILSON, L.; TOMASELLO, G. Temperature optimization for reactor operation with chitin-immobilized lactase under modulated inactivation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v.27, p.270-278, 2000.

ITOH, T.; XIA, J.; MAGAVI, R.; NISHIHATA, T.; RYTTING, J.H. Use of snake as a model membrane for in vitro percutaneous penetration studies: comparison with human skin. **Pharmaceutical Research**, New York, v.7, n.10, p.1042-1047, out. 1990.

KHANDEPARKAR, R.D.S.; BHOSLE, N.B. Isolation, purification and characterization of the xylanase produced by *Arthrobacter* sp. MTCC 521 when grown in solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Amsterdam, v.39, n.4, p.732-742, 2006.

KLEMENCIC, I.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M.H.S.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; GUNCAR, G.; TURK, D.; KRIZAJ, I.; TURK, V.; TURK, B. Biochemical characterization of human cathepsin X revealed that the enzyme is an exopeptidase, acting as carboxymonopeptidase or carboxydipeptidase. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.267, p.5404–5412, 2000.

KRAUT, J. Serine-peptidases - structure and mechanism of catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.46, p.331-358, Jul. 1977.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline peptidases: From a bioindustrial viewpoint. **Biotechnology Advances**, New York, v.17, p.561–594, 1999.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995.
- LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHIMIDELL, W. Produção de Enzimas Microbianas. **Biotecnologia Industrial**: volume 2 e 4; 1ª edição. São Paulo, 2001.
- LOUIS, D.; BERNILLON, J.; PAISSE, J.O.; WALLACH, J.M. Use of a liquid chromatography–mass spectrometry coupling for monitoring the serralysin-catalyzed hydrolysis of a peptide library. **Journal of Chromatography B.**, Amsterdam, v.732, p.271–6, 1999.
- MAEDA, H.; MORIHARA, K. Serralysin and related bacterial proteinases. **Methods in enzymology Academic Press**, London, v.248, p.395–413, 1995.
- MAHAJAN, R.T.; BADGUJAR, S.B. “Biological aspects of proteolytic enzymes: a review,” **Journal of Pharmacy Research**, v.3, n.9, p.2048–2068, 2010.
- MARCHISIO, F.V. *Keratinophilic fungi*: their role in nature and degradation of keratinic substrates. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, p.86–92, 2000.
- MAURER, K.H. Detergents peptidases. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.15, n.3, p.330-334, ago. 2004.
- MEEVOOTISOM, V., NIEDERPRUEM, D.J., 1979. Control of extracellular peptidases in dermatophytes and especially *Trichophyton rubrum*. **Sabouraudia**, Oxfordshire, v.17, p.91–106, 1979.
- MENDONÇA, E.G. **Propriedades bioquímicas e cinetico-enzimáticas de cisteino-peptidases do intestino médio de largata da soja**. 63p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG, 2008.
- MOREIRA, F.G.; SOUZA, C.G.M.; COSTA, M.A.; REIS, S.; PERALTA, R.M. Degradation of chicken feathers by *Myrothecium verrucaria*. **Mycopathologia**, Holanda, 2006.
- MORIHARA, K.; ODA, K. Microbial degradation of proteins. In: GUENTHER, W. (Ed.). Microbial degradation of natural products. **Weinheim**, Germany: VCH Publishers, 1993. p.293-364.

- MUHSIN, T.M., HADI, R.B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Mycopathologia**, Holanda, v.154, p.185–189, 2002.
- NAMALDI, A.; CALIK, P.; ULUDAG, Y. Effects of spray drying Temperature and additives on the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. **Drying Technology**, New York, v.24, p.1495-1500, 2006.
- NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes- a practical approach**, Oxford: JRL Press, p.259, 1990.
- NIGAM, P.S. Production of bioactive secondary metabolites. In: Nigam, P.S.; Pandey, A. **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization**, Springer Science+ Business Media, 2009.
- PATEL, R.N. Microbial/ enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals. **Enzyme and Microbial Technology**, Atlanta, v.31, n.6, p.804-826, nov.2002.
- PEKKARINEN, A.I.; JONES, B.L.; NIKU-PAAVOLA, M. Purification and properties of an alkaline proteinase of *Fusarium culmorum*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v.269, p.798–807, 2002.
- PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. Lipasecatalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activatedbleaching earth. **Process Biochemistry**, London, v.38, n.7, p.1077-1082, fev.2003.
- QUEIROZ, S.C.N.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, São Paulo, v.24, n.1, p.68-76, 2001.
- RAMNANI, P., GUPTA, R.. Optimization of medium composition for keratinase production on feather by *Bacillus licheniformis* RG1 using statistical methods involving response surface methodology. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Duluth, v.40, p.191–196, 2004.
- RAO, M.B.; APARNA, M.T.; GHATGE, M.S.; DESHPANGE, V.V. Molecular and biotechnological aspects of microbial peptidases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, p.597-665. 1998.
- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v.290, p.205-218, 1993.

- RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J., Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, London, p.205-18, 1993.
- RIES, S.M.; ALBERSHEIM, P. Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v.63, p.625-629, 1973.
- RIFFEL, A.; BRANDELLI, A.; BELLATO, C.M.; SOUZA, G.H.M.F.; EBERLIN, M.N.; TAVARES, F.C.A. Purification and characterization of a keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium* sp. kr6. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.128, p.693-703, 2007.
- SANT'ANNA JUNIOR, G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biocnologia industrial processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001, p.351-362.
- SANTOS, J.A.N. **Inibição e especificidade da Lbpro do vírus da febre aftosa**. 2009. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 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.
- SAREEN, R.; MISHRA, P. Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-3. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v.79, p.399-405, 2008.
- SATOSHI, U.; NORIAKI, I. Partial purification and characterization of pro-phospholipase A2 activating peptidases from gill membranes of the red sea bream, *crysophrys major*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, New York, v.141, p.121-127, 2005.
- SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 27, p. 157-162, 1967.
- SCRIBAN, R. **Biocnologia**. São Paulo: Manole, p.489, 1985.
- SEN, S., SATYANARAYANA, T., 1993. Optimization of alkaline protease production by thermophilic *Bacillus licheniformis* S40. **Journal of Microbiology**, v.33, p.43-47, 1993.



SILVA, T.A.C. **Caracterização bioquímica e secagem em "spray dryer" de lipases produzidas pelo fungo *Cercospora kikuchii***. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2010.

SIM, Y.C.; NAM, Y.S.; SHIN, E.; KIM, S.; CHANG, I.S.; RHEE, J.S. Proteolytic enzyme conjugated to SC-glucan as transdermal drug penetration enhancer. **Pharmazie**, Berlin, v.58, n.4, p.252-256, abr. 2003.

SINGH, C.J. Exocellular peptidases of *Malbranchea gypsea* and their role in keratin deterioration. **Mycopathologia**, Holanda, v.143, p.147-150, 1998.

SUMANTHA, A. Production and partial purification of a neutral metalloprotease by fungal mixed substrate fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v.43, p.313-319, 2005.

THYS, R.C.S. **Produção, caracterização, purificação e aplicação de uma protease produzida pelo microrganismo *Microbacterium SP-kr10***. 114p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre – RS. 2004

TOMÉ, R.; MARQUES, G. Gresmine. In: TOMÉ, R. Atlas Micologia. Disponível em: <<http://atlasmicologia.blogspot.com.br/search/label/Scopulariopsis>>. Acesso em 12 de dez. 2013.

TOWNS, J.K. Moisture content in proteins: its effects and measurement. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v.705, p.115-127, 1995.

TRAN, L.H.; NAGANO, H. Isolation and characteristics of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production. **Journal of Food Science**, v. 67 n. 3, p. 1184-1187, 2002.

TREVAN, M.D.; BOFFEY, S.; GOULDING, K.H.; STANBURY, P. **Biotechnologia: Princípios biológicos**, Espanha, Zaragoza: Acribia, p.284, 1990.

**UNITED States Pharmacopeia**. General Chapter. 24. ed. Rockville: United States Pharmacopeical Convention, p.2481, 2005.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**, Moscow, v.69, n.11, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VERMELHO, A. B. et al. **Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas**. In: Elba P.S.Bon; Maria Antonieta Ferrara; Maria Luísa Corvo. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicação e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciências Ltda, 2008.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G.; FAVELATORRES, E.; AGUILAR, C. N.; RÓMEROGOMES, S. J.; DÍAZ-GODÍNEZ, G.; AUGUR, C. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation system. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.13, n. 2, p.157-167, mar. 2003.

VITOLO, M. 2001. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Coords.). **Biotecnologia na produção de alimentos**, São Paulo: Edgard Blücher Ltda., p.387-420, 2001.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, **International Journal of Pharmaceutics**, v.203, p.1-60, 2000.

WARD, O.P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). **Microbial enzymes and biotechnology**. Applied Science Publishers, London, p.251-305, 1983.

WISEMAN, A. **Handbook of enzyme Biotechnology**, New York: John Wiley Sons, 1985.

WISEMAN, A. **Manual de biotecnologia de los enzimas**, Espanha, Zaragoza: Acribia, p.444, 1991.

ZANPHORLIN, L.M.; CABRAL H.; ARANTES E.; ASSIS, D.; JULIANO L.; JULIANO M.A.; DA-SILVA R.; GOMES E.; BONILLA-RODRIGUEZ G.O. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, London, v.46, p.2137–2143, 2011.