



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA NÍVEL MESTRADO

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA
PRODUÇÃO DE PROTEASES UTILIZANDO LEITE DESNATADO
COMO SUBSTRATO**

GEISI MARIA HENRIQUE DA SILVA

João Pessoa – PB

2019

GEISI MARIA HENRIQUE DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA
PRODUÇÃO DE PROTEASES UTILIZANDO LEITE DESNATADO
COMO SUBSTRATO**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Nível Mestrado para
obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia.

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral
Orientador

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa
Coorientadora

João Pessoa – PB

2019

**Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação**

S586b Silva, Geisi Maria Henrique da.

Bioprospecção de fungos filamentosos para produção de
proteases utilizando leite desnatado como substrato /
Geisi Maria Henrique da Silva. - João Pessoa, 2019.

71 f. : il.

Orientação: Ian Porto Gurgel do Amaral.

Coorientação: Adna Cristina Barbosa de Sousa.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Biotecnologia. 2. Paecilomyces. 3. Penicillium. 4.
Clonostachys. 5. Protease. 6. Fermentação. 7. Leite
desnatado. 8. Fungos filamentosos. I. Amaral, Ian Porto
Gurgel do. II. Sousa, Adna Cristina Barbosa de. III.
Título.

UFPB/BC

CDU 60(043)

Geisi Maria Henrique da Silva

**BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS PARA
PRODUÇÃO DE PROTEASES UTILIZANDO LEITE DESNATADO
COMO SUBSTRATO**

Trabalho de Dissertação submetido ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia
Nível Mestrado da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para
obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral (UFPB – Centro de Biotecnologia)
(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Adna Cristina Barbosa de Sousa (UFPB – Centro de Biotecnologia)
(Coorientadora)

Prof^a. Dr^a. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes (UFPB – Centro de Biotecnologia)
(Examinador)

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski (UFPB – Centro de Biotecnologia)
(Examinador)

Emitido em 09/09/2020

COMUNICADO Nº 1/2020 - PGBiotecM (11.01.44.05)
(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 14/09/2020 11:07)
ULRICH VASCONCELOS DA ROCHA GOMES
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2009494

(Assinado digitalmente em 14/09/2020 15:58)
ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2016620

(Assinado digitalmente em 14/09/2020 10:28)
IAN PORTO GURGEL DO AMARAL
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
2016711

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sinac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 1,
ano: 2020, documento (espécie): COMUNICADO, data de emissão: 14/09/2020 e o código de verificação:
d456814f39

Dedico este trabalho ao Meu sempiterno Deus e Senhor, ao meu Esposo Izaías Júnior, por ser uma demonstração personificada do cuidado desse Deus em minha vida e a nossa filha, já muito amada, Lorena, a qual estamos a espera ansiosa e prazerosa.

AGRADECIMENTOS

Manifesto minha gratidão ao **DEUS** bendito, pela sua misericórdia e graça, que me alcança de modo admirável, ao ponto de eu poder ter essa oportunidade de ingressar e concluir uma pós-graduação.

Agradeço à instituição, **Universidade Federal da Paraíba**, especialmente ao **Centro de Biotecnologia**, pelo espaço e estrutura indispensáveis para realização deste trabalho e a **FAPESQ-CAPES** pelo fomento a esta pesquisa.

Agradeço de modo especial aos meus orientadores, **Dr. Ian Porto Gurgel do Amaral** e **Dr^a Adna Cristina Barbosa de Sousa** pela confiança, paciência e sobretudo a transferência e referencial do saber científico, e também por ser referenciais de profissionais e indivíduos. A vocês minha distinta admiração e respeito.

À banca avaliadora, **Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes** e **Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski** por atender gentilmente ao convite de contribuir com esse trabalho através das avaliações.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia que impactaram a minha vida de forma individual e singular. Em especial sou grata ao **Prof. Dr. Jailson Rocha**, por ter a oportunidade de concluir essa jornada com uma disciplina que possibilitou reflexões, empatia mútua, ampliação da visão do ser acadêmico e social.

À minha família, pelos seus incentivos e apoios incomparáveis, que me fizeram imaginar uma realidade totalmente inalienável em outros tempos, a de prosseguir nos estudos e hoje poder ter um título que me faz ser referência aos que me cercam. É com muito carinho e responsabilidade que levarei esse privilégio/dádiva comigo. Em vocês que encontro o sentido, a força e a razão de continuar. São esses, minha mãe, **Geísa**, meu Pai, **Juscelino**, minha irmã, **Jéssica**, meu cunhado, **Anderson**, sobrinhos, **Anthony** e **João Lucas** e meus Avós, **Geraldo e Maria**.

Ao meu amado esposo **Izaías Henrique da Silva Júnior** pelo seu companheirismo, cuidado, encorajamento e incentivo, que foram cruciais nos momentos obscuros dessa caminhada. Mas também por ser meu parceiro no regozijo das conquistas e avanços, as quais só fazem sentido por que você está perto.

Aos meus colegas de laboratório e ambiente acadêmico, de hoje e os de outrora, como **Arauana, Paloma, Olívia, Elizante, Camila Farias, Ubiratan, Brendo** e com destaque especial, **Cibele Queiroz**. Por tornarem esses ambientes um espaço de cumplicidade, em razão do sentimento de cooperação e amizade partilhado por todos.

Aos colegas do curso, com destaque singular a **Yasmim** e **Nívea**. Mulheres que além da parceria, com lições e incentivos mútuos, tornaram-se referências para mim.

Ao meu grupo de amigos: **Rebeca, Rayanne, Benjamim, Cleiciany, Fábio, Jaqueline, Sérgio, Carol, Danilo, Rafael e Tatiane**. Esse grupo que desde a

infância ajuntam conquistas, desafios, alegrias, sonhos realizados, e sou grata por este momento ser mais um que compartilho com vocês.

Aos casais de amigos, **Renállyde e Rubem; Samuel e Amanda; Júnior e Ana Cristina; Roseilton e Lena**. Pessoas que são cooperadores conosco em diversos aspectos de nossas vidas, ao qual o convívio e auxílio me fizeram, durante essa jornada, voltar meu pensamento as razões do porquê e para quê continuar a seguir e concluir, que é fazer tudo para a Glória de Deus.

Por fim, agradeço aos amigos de convívio quase diário, tanto perto como longe, com destaque a **Camila Amaro**. Amiga que talvez não tenha a real noção de como foi importante, através de mensagens de apoio, do abraço revigorante e do simples fato de estar e ser amiga.

Gratidão à Todos!

*“Ó Senhor, honrarei e louvarei teu nome, pois és
meu Deus. Fazes coisas maravilhosas! Tu as
planejastes há muito tempo e agora as
realizastes”.*

Isaías 25:1

RESUMO

Os fungos filamentosos são organismos de alta relevância na produção de bioativos. Um exemplo de compostos bioativos são as enzimas, tais como as proteases, envolvidas em importantes modificações metabólicas, as quais se destacam no uso em processos industriais de diversas áreas. No entanto, cada vez mais vê-se a necessidade da busca de enzimas com características mais atrativas para a indústria e com baixo custo de produção. Diante disso, o presente trabalho objetivou a bioprospecção de fungos filamentosos para a produção de protease por fermentação submersa utilizando o leite desnatado com substrato indutor. Dois isolados fúngicos oriundos dos ovos de peixe-zebra, foram submetidos a análise macroscópica (crescimento em placa de Petri) e microscópica (cultura em lâmina), e de potencial de produção proteolítica em meio sólido ágar-Leite, o qual demonstrou pertencerem aos gêneros *Penicillium* sp. e *Clonostachys* sp. e apresentarem atividade positiva para protease. Os isolados de *Beauveria brongniartii* e *Paecilomyces* sp., foram anteriormente analisados. Para a produção de protease, foram inoculados 0,5 mL de suspensão de conídios (1×10^9 conídios/mL) em 50 mL de meio leite desnatado (5%), durante 5 dias a 180 rpm, TA. A atividade proteolítica foi determinada pelo método da azocazeína e ácido tricloacético (TCA). Os extratos brutos dos processos fermentativos mostraram atividades de 1,3 U/mL para *Clonostachys* sp, 4,6 U/mL para *Penicillium* sp., 6,9 U/mL para *Beauveria brongniartii* e 30,3 U/mL para *Paecilomyces* sp. O extrato bruto que demonstrou maior atividade foi submetido a purificação parcial usando etanol (0-80%). Onde não obteve um aumento expressivo na pureza. A fração purificada por solvente orgânico com maior atividade enzimática total (5,688 U), foi submetida à purificação por Cromatografia por Troca iônica em coluna de DEAE-Celulose, com fluxo de 1mL/min e fase móvel de Tris-HCl 0,1M pH 8,0. A enzima purificada apresentou 35% de rendimento e taxa de purificação de 16,08 vezes. Após a purificação a protease de *Paecilomyces* sp. foi caracterizada quanto a classe, temperatura ótima, termoestabilidade e cinética enzimática. Foram utilizados inibidores de serino-protease dos quais não observou inibição, demonstrando que a protease produzida não pertence a essa classe. A atividade enzimática foi analisada em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C), demonstrando maior atividade em 50 °C, para o extrato bruto e 35 °C, para a enzima purificada. Quanto a estabilidade térmica, a protease do extrato bruto, após ser incubada nas temperaturas 25; 35; 40; e 45 °C, demonstrou maior estabilidade nas primeiras 2h, em 45 °C. Os parâmetros cinéticos foram encontrados experimentalmente, utilizando diferentes concentrações de azocaseína – 0,1 a 3,0% (p/v) –, dos quais viu-se os valores de $K_m = 0,142\%$ e $V_{m\acute{a}x} = 6,8$ U/mL. Diante dos resultados obtidos conclui-se que os fungos utilizados foram capazes de produzir protease por fermentação submersa e que o meio leite desnatado é um substrato potencial para produção de enzimas proteolíticas.

Palavras-chave: *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Clonostachys*, protease, fermentação submersa, leite desnatado.

ABSTRACT

Filamentous fungi are highly relevant organisms in the production of bioactives. An example of bioactive compounds are enzymes, such as proteases, involved in important metabolic changes, which stand out in their use in industrial processes in several areas. However, the need to search for enzymes with more attractive characteristics for the industry and with low production cost is increasingly seen. In view of this, the present work aimed at the bioprospecting of filamentous fungi for the production of protease by submerged fermentation using skimmed milk with inducing substrate. Fungal isolates from zebrafish eggs were subjected to macroscopic (growth in Petri dish) and microscopic (cover slip culture) analysis, and the potential for proteolytic production in solid agar-milk medium, which proved to belong to the genera *Penicillium* sp. and *Clonostachys* sp. and show positive protease activity. The isolates of *Beauveria brongniartii* and *Paecilomyces* sp., Were previously analyzed. For the production of protease, 0.5 ml of conidia suspension (1×10^9 conidia / ml) was inoculated in 50 ml of skimmed milk (5%), for 5 days at 180 rpm, RT. Proteolytic activity was determined using the azocasein and trichloroacetic acid (TCA) method. The crude extracts from the fermentation processes showed activities of 1.3 U / mL for *Clonostachys* sp, 4.6 U / mL for *Penicillium* sp., 6.9 U / mL for *Beauveria brongniartii* and 30.3 U / mL for *Paecilomyces* sp. The crude extract that showed greater activity was subjected to partial purification using ethanol (0-80%). Where there was no significant increase in purity. The fraction purified by organic solvent with the highest total enzymatic activity (5.688 U), was subjected to purification by Ion Exchange Chromatography on a DEAE-Cellulose column, with a flow of 1mL / min and a mobile phase of 0.1M Tris-HCl pH 8 , 0. The purified enzyme showed 35% yield and a purification rate of 16.08 times. After purification, the protease from *Paecilomyces* sp. was characterized in terms of class, optimal temperature, thermostability and enzymatic kinetics. Serine protease inhibitors from which no inhibition was observed were used, demonstrating that the protease produced does not belong to this class. The enzymatic activity was analyzed at different temperatures (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60 ° C), showing greater activity at 50 ° C, for the crude extract and 35 ° C, for the purified enzyme. As for thermal stability, the protease of the crude extract, after being incubated at temperatures 25; 35; 40; and 45 ° C, demonstrated greater stability in the first 2h, at 45 ° C. The kinetic parameters were found experimentally, using different concentrations of azocasein - 0.1 to 3.0% (w / v) -, of which the values of $K_m = 0.142\%$ and $V_{max} = 6.8$ U / mL were seen. In view of the results obtained, it is concluded that the fungi used were capable of producing protease by submerged fermentation and that the skimmed milk medium is a potential substrate for the production of proteolytic enzymes.

Keywords: *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Clonostachys* sp., Protease, submerged fermentation, skimmed milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fiálides divergentes e longas cadeias emaranhadas de conídios elípticos, provenientes de estruturas de frutificação mais complexas, características de <i>Paecilomyces lilacinus</i> , 460x.	19
Figura 2. <i>Clonostachys rósea</i> . (a) Conidióforos verticilados (escala = 100 µm); (b) Conidióforos penicilados (escala = 10 µm); (c) Esporos (escala = 10 µm); (d) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de conidióforos penicilados (escala = 10 µm); (e) MEV de uma massa de esporos em um conidióforo penicilado (escala = 15 µm) e (f) MEV de esporos (escala = 3 µm).	20
Figura 3. <i>Penicillium</i> spp. (A) Microscopia. (B) Cultura.	22
Figura 4. Crescimento em placa de Petri, contendo meio Ágar-Sabouraud-Dextrose de <i>Beauveria brongniartii</i>	23
Figura 5. Descrição morfológica de <i>Beauveria bassiana</i>	24
Figura 6. Uma visão global das aplicações das proteases.	28
Figura 7. Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: κ-caseína, E: grupo fosfato).	31
Figura 8. Placa de Petri com cultura em lamínula.	35
Figura 9. Frascos de Erlenmeyer contendo meio leite fermentado pelos fungos <i>Beauveria brongniartii</i> , <i>Paecilomyces</i> sp., <i>Penicillium</i> sp. e <i>Clonostachys</i> sp, após 120 horas de incubação.	38
Figura 10. Colônias de fungos obtidas da amostra de água do aquário de peixe-zebra, após 5 dias de crescimento à 28 °C ± 1.	42
Figura 11. Macro e microscopia dos fungos isolados do aquário de peixe-zebra. <i>Penicillium</i> sp. (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia); <i>Clonostachys</i> sp. (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia).	44
Figura 12. Perfil de eluição da fração 30-80% de proteases de <i>Paecilomyces</i> sp. ..	48
Figura 13. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da protease do extrato bruto de <i>Paecilomyces</i> sp.	52
Figura 14. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da protease purificada de <i>Paecilomyces</i> sp.	52
Figura 15. Determinação da estabilidade térmica da protease do extrato bruto de <i>Paecilomyces</i> sp.	53
Figura 16. Perfil cinético com variação do substrato para a enzima purificada de <i>Paecilomyces</i> sp. As amostras foram ensaiadas (30µl) sobre a solução de azocaseína em diferentes concentrações, incubação de 1 hora a TA.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem dos isolados	36
Tabela 2. Composição meio Ágar-Leite-Gelatina.	36
Tabela 3. Dados de purificação da protease de <i>Paecilomyces</i> sp. produzida por fermentação submersa em meio leite desnatado.	49
Tabela 4. Análise da atividade enzimática do ensaio de inibição com inibidores de serino-protease.	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
°C	Grau celsius
µL	Microlitro
Atm	Atmosfera
C/N	carbono/nitrogênio
CAGR	Compound Annual Growth Rate
CBIOTEC	Centro de Biotecnologia
DEAE	Dietilaminoetil celulose
DMSO	Dimetilsulfóxido
ES	Enzima-substrato
ESS	Enzima-substrato-substrato
FES	Fermentação em estado sólido
FmS	Fermentação submersa
g/L	Gramas por litro
h	Hora
LABOrA	Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos
LAMA	Laboratório de Microbiologia Ambiental
LGM-BIOTEC	Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal
M	Molar
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
Nm	Nanômetro
p/v	peso/volume
pH	Potencial hidrogeniônico
PMSF	Fluoreto de fenil-metil-sulfonil
Rpm	Rotação por minuto

TCA	Ácido tricloroacético
TLCK	Tosil-L-lisil-clorometano
TPCK	Tosil-L-fenilalanil-clorometano
U/mL	unidade/mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
2.1 Fungos Filamentosos e a Biotecnologia	17
2.2 <i>Paecilomyces</i>	18
2.3 <i>Clonostachys</i> sp.	20
2.4 <i>Penicillium</i> sp.	21
2.5 <i>Beauveria brongniartii</i>	23
2.6 Proteases e aplicações	24
2.7 Processo de produção de enzimas	28
2.7.1 <i>Fermentação Submersa</i>	29
2.7.2 <i>Leite desnatado como substrato alternativo</i>	30
3 OBJETIVO GERAL	33
3.1 Objetivos Específicos.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Coleta e isolamento dos fungos do aquário de peixe zebra.....	34
4.1.1 Meio de cultura.....	34
4.1.2 Caracterização dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra	34
4.1.3 Cultura em lamínula	34
4.1.4 Identificação dos isolados fúngicos.....	35
4.1.5 Manutenção das linhagens fúngicas	35
4.1.6 Isolados fúngicos	35
4.1.7 Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos do aquário de peixe-zebra	36
4.2 Produção enzimática.....	37
4.2.1 Produção de conídios	37
4.2.2 Produção enzimática em fermentação submersa	37
4.2.3 Extração enzimática.....	38
4.2.4 Análise da atividade enzimática	39
4.3 Purificação	39
4.3.1 Precipitação com etanol	39
4.3.2 Cromatografia por Troca iônica.....	40
4.4 Caracterização das proteases.....	40
4.4.1 Inibidores de serino-protease.....	40

4.4.2 <i>Análise da temperatura ótima e termoestabilidade</i>	41
4.4.3 <i>Cinética enzimática</i>	41
4.5 <i>Análise estatística</i>	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 <i>Caracterização dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra</i> ...	42
5.1.1 <i>Coleta e isolamento dos fungos do aquário de peixe zebra</i>	42
5.1.2 <i>Identificação macroscópica e microscópica dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra</i>	42
5.1.3 <i>Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos do aquário</i>	44
5.2 <i>Produção enzimática por fermentação submersa</i>	45
5.3 <i>Purificação</i>	47
5.4 <i>Caracterização das proteases</i>	49
5.4.1 <i>Inibidores de serino-protease</i>	49
5.4.2 <i>Análise da temperatura ótima e termoestabilidade</i>	51
5.4.3 <i>Cinética enzimática</i>	53
6 CONCLUSÕES	56
7 REFERÊNCIAS.....	57

1 INTRODUÇÃO

Os fungos filamentosos são organismos amplamente diversos e distribuídos em todos os ecossistemas existentes. Podendo ser decompositores, mutualistas ou patógenos, essa classe de microrganismos apresenta características metabólicas notáveis, tornando-se importantes produtores de compostos biotecnológicos que atingem diretamente nossas vidas em vários aspectos.

Dentre os agentes biológicos de alta relevância biotecnológica, os fungos filamentosos são conhecidos como grandes produtores de enzimas. As enzimas são proteínas que possuem atividades catalíticas 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, COX, & NELSON, 1985). As proteases são enzimas que atuam catalisando a hidrólise de ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas, resultando em peptídeos ou aminoácidos livres (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015).

Além de se destacarem em vários eventos fisiológicos, as proteases também representam uma das enzimas mais importantes no cenário industrial (Kumar et al, 2005). Onde a sua produção está ligada majoritariamente no uso pela indústria de detergentes, mas observa-se também sua importância na indústria cervejeira, de couro, farmacêutica, alimentícia, bioetanol, química fina e entre outros (Kumar et al, 2005; DA SILVA et al., 2012).

O comércio de enzimas hidrolíticas cresce a cada ano. Relatórios do mercado de enzimas estima US \$ 5,9 bilhões em 2020, e a projeção é que a taxa de crescimento anual composta (CAGR) cresça 6,5%, o que fará atingir valores de US \$ 8,7 bilhões em 2026 (MARKET AND MARKETS, 2020). Neste cenário a protease é uma enzima de grande destaque, pois movimenta cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. Este crescimento é alavancado pela contínua demanda de enzimas mais robustas para os diferentes fins.

A obtenção de enzimas em escala industrial pode ser possível através de processos fermentativos, no qual corresponde a introdução de um agente biológico no meio de cultivo, com vistas à produção ou modificação do substrato. Logo a escolha do microrganismo é de extrema relevância para uma eficiente e satisfatória produção (SCHMIDELL et al., 2001). De modo que trabalhos que bioprospectam e analisam a capacidade de isolados fúngicos, quanto à produção de enzimas

hidrolíticas importantes para setores biotecnológicos são cada vez mais pertinentes para o cenário mundial do mercado de enzimas.

Dentre os processos fermentativos mais utilizados para obtenção de enzimas, têm-se o que se configura em meio líquido com os nutrientes em solução, chamado de fermentação submersa (FS) (ALONSO, 2001), e a fermentação em estado sólido (FES), que caracteriza-se em um processo com ausência, ou quase ausência de água livre, onde utiliza-se um substrato sólido, o qual fornece os nutrientes, como também a estrutura de ancoragem para o crescimento celular microbiano (SHARMA et al., 2017).

Para garantir um alto rendimento e um sucesso na produção de enzimas é necessária a análise de certos parâmetros, dos quais os principais são: agitação, temperatura, aeração e pressão (CRUEGER; CRUEGER, 1993). Tais parâmetros são bem mais fáceis de serem avaliados na fermentação submersa, conferindo assim uma vantagem com relação à fermentação em estado sólido. No entanto, para ambos os processos, o meio de cultura para o crescimento microbiano é a parte onerosa da produção de enzimas proteolíticas, sendo avaliado entre 30-40% dos custos de produção (JOO e CHANG, 2005; NASCIMENTO e MARTINS, 2006).

A produção de protease utilizando o leite desnatado como substrato indutor, pode ser uma alternativa para otimização e potencialização do processo de produção, contribuindo no crescimento do microrganismo como também para a expressão de enzimas proteolíticas. Pois o leite possui proteínas, açúcares (lactose), minerais e vitaminas (SGARBIERI, 2005). Há também mais de vinte compostos metálicos que são cofatores enzimáticos de diversas enzimas, com diferentes funções biológicas importantes (GASMALLA et al., 2013). Tudo isso confere ao leite desnatado a característica de ser um meio de cultivo promissor para a produção de proteases de interesse industrial.

Diante desses pressupostos, o presente estudo possui a finalidade de bioprospecção de fungos filamentosos (*Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.* e *Clonostachys sp.*) com vista a análise quanto a capacidade de produção de proteases por fermentação submersa, utilizando como substrato alternativo o leite desnatado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Fungos Filamentosos e a Biotecnologia

Os fungos filamentosos são microrganismos eucarióticos, heterotróficos, com reprodução assexuada e sexual (PIEPENBRING et al., 2015), compondo um grupo de espécies que formam estruturas pluricelulares formados por filamentos de hifas, as quais são caracterizadas como unidades celulares (STEINBERG, 2007; GARCÍA-REYES et al., 2017). São organismos de morfologia complexa, com presença de organelas celulares e complexo mecanismo de crescimento celular, caracterizado, além de outros aspectos, pela presença do citoesqueleto (DRIOUCH, SOMMER e WITTMANN, 2010; GARCÍA-REYES et al., 2017). Outro fato importante desses organismos é a parede celular, composta por polissacarídeos (quitina e β -glicano) e glicoproteínas, que são responsáveis pela estrutura fibrilar desta parede celular (PREECHASUTH et al., 2015; SERRANO-CARREÓN et al., 2015).

A presença de filamentos, característica de crescimento celular desses organismos, é um contraponto em relação ao tratamento terapêutico de patologias oriundas de fungos filamentosos, porém para o mercado, os fungos filamentosos, possuem uma alta relevância (GHIMIRE; JIN, 2017). Uma mesma espécie fúngica pode apresentar diferentes formas de crescimento. É possível observar outras agregações das estruturas celulares, como os *pelletes*, que compõe hifas fortemente entrelaçadas e compactadas formando estruturas esféricas ou semiesféricas (VEITER, RAJAMANICKAM e HERWIG, 2018). Essas alterações estruturais podem estar relacionadas às condições de cultivo que o microrganismo venha a ser submetido (HYDE, et al, 2014). Aproveitando-se do metabolismo de fungos filamentosos é possível produzir diversas enzimas, pigmentos, antibióticos, alimentos fermentados, vitaminas, metabólitos complexos, com ampla potencialidade na indústria farmacêutica, agrícola, ambiental, entre outras (GERNGROSS, 2004; FRISVAD, ANDERSEN e THRANE, 2008; DELGADO-RAMOS ET AL., 2014; GARCÍA-REYES et al., 2017).

O interesse da indústria biotecnológica por bioprocessos utilizando biomassa fúngica é progressivo, principalmente em razão de que, através da biotecnologia, é possível explorar industrialmente as atividades bioquímicas intrínsecas desses organismos. Os fungos demonstram características metabólicas notáveis devido a

uma aprimorada rede genômica, implicando na produção de compostos biotecnológicos que interagem e influenciam enormemente a vida de outros organismos de diferentes maneiras (TORRES-BARAJAS e AGUILAR-OSORIO, 2013; GARCÍA-REYES ET AL., 2017).

Como exemplos de fungos com alta potencialidade biotecnológica têm-se *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces spp.*, *Penicillium spp.* e *Clonostachys spp.*, fungos filamentosos com ação entomopatogênica (INGLIS; TIGANO, 2006; LEFORT et al, 2014), geralmente empregados no controle biológico de pragas da agricultura e pecuária. O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos compõe, entre outros aspectos, a produção de exoenzimas envolvidas no processo de penetração do tegumento do hospedeiro (ALVES, 1998). Na literatura, observamos que a capacidade de virulência está intrinsecamente relacionada à produção de enzimas extracelulares como proteases e quitinases (ALVES, 1998; CZECHOT, 2016). Contudo há escassez de estudos demonstrando a capacidade produtiva destes microorganismos, como também as características dessas enzimas visando o uso na indústria.

2.2 *Paecilomyces*

O gênero *Paecilomyces* foi originalmente descrito por Bainier (1907) para comportar apenas uma espécie, o *Paecilomyces varitotti*. No entanto, posteriormente, diversas revisões foram realizadas (HUGHES, 1951; BROWN e SMITH, 1957; MORRIS, 1963; ONIONS E BARRON, 1967; HOOG et al., 1972; SAMSON, 1974; e LIANG et al., 2009) até atingir o número de trinta e uma espécies (SINHA, CHOUDHARY e KUMARI, 2016). Quanto aos aspectos morfológicos, são espécies fúngicas com hifas hialinas, amareladas, septadas e lisas (MOREIRA, OLIVEIRA & BORBA, 2018). As estruturas conidiogênicas são constituídas por conidióforos de ramos verticilados com forma espiralar e irregular contendo fiálides (células conidiogênicas), tais células possuem o formato oval ou subgloboso com pescoço longo e distinto, produzindo conídios hialinos, unicelulares, claros e em cadeias basipetais (BORBA e BRITO, 2015) (SINHA, CHOUDHARY e KUMARI, 2016) (Figura 1).

Figura 1. Fiálides divergentes e longas cadeias emaranhadas de conídios elípticos, provenientes de estruturas de frutificação mais complexas, características de *Paecilomyces lilacinus*, 460x.



Fonte: CAREY et al, 2003.

Paecilomyces possui ação patogênica (SAMSON, 1974) (SERYCZYŃSKA e BAJAN, 1975) comprovada em mais de 40 espécies de insetos (BAKERI, et al., 2009), como também possuem ação nematocida (SINHA, CHOUDHARY e KUMARI, 2016), sendo patogênico a alguns nematoides prejudiciais, como ovos de *Taenia saginata* (BRAGA et al., 2008). Das espécies mais usadas no controle biológico, lista-se *P. farinosus*, *P. lilacinus*, *P. fumosoroseus* (OLIVEIRA, 2003). São encontrados em diferentes locais, por serem geograficamente bem difundidos, de modo que há isolados em regiões como solo, lama de esgoto, alimentos, florestas, combustíveis (diesel), entre outros (GUEDES et al., 2018). Essa alta disseminação pode estar relacionada à habilidade de manter-se em habitat ácidos, e também da capacidade de tolerar condições microaerofílicas (MOREIRA, OLIVEIRA e BORBA, 2018). Algumas espécies desse gênero possuem também uma relevância clínica por produzirem infecções em pacientes imunocomprometidos e imunocompetentes (BORBA e BRITO, 2015).

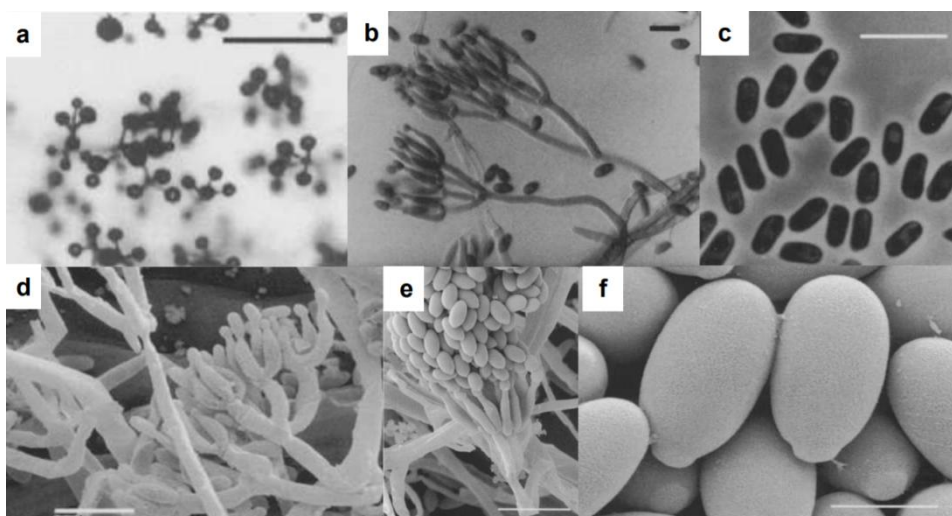
Outro aspecto atualmente relevante com relação ao uso desses fungos é o seu potencial catalítico como biofábricas, pelo fato de serem fontes de metabólitos secundários e de uma grande variedade de enzimas extracelulares de alta eficiência, capazes de transformar uma forma de energia em outra, e converter resíduos ou substratos de baixo custo em bioprodutos de alto valor agregado (HERRERA BRAVO DE LAGUNA; TOLEDO MARANTE; MIOSO, 2015). Tais bioprodutos tem ampla aplicabilidade em vários processos biotecnológicos, em

diversas áreas como, saúde humana, nutrição humana e animal, produtos químicos finos e biocombustíveis (MICHELIN, et al., 2010) (ZERVA, et al., 2014) (LOPES et al., 2017) (RODRIGO et al, 2017) (ALI, 2017).

2.3 *Clonostachys* sp.

O gênero *Clonostachys* apresenta espécies saprófitas de ação parasitária (ZEILINGER et al, 2016), entomopatogênica (TOLEDO, 2006), nematocida (DONG et al., 2004; ZHAO et al., 2005; LI et al., 2006), antifúngica (BORGES, SARAIVA e MAFFIA, 2015; BOREL, 2018) e liquenícola (MOREIRA, 2012). As colônias são caracterizadas por apresentarem conidióforos primários (verticilados) e secundários (penicilados), sendo o segundo a forma diferenciada. Os conidióforos podem apresentar-se em esporodóquio. Os conídios têm formas assimétricas, ligeiramente curvados e dispostos em cadeias, apresentando pigmentação branca, laranja-clara ou verde (SCHROERS, 2001; MOREIRA, 2012) (Figura 2). Podem ser encontrados em toda parte do mundo, em diversos ecossistemas, desde regiões tropicais a florestas temperadas (SUTTON, 1997). Locais onde fungos desse gênero foram isolados possuíam pH variando entre neutro e alcalino (VICCINI, 2009).

Figura 2. *Clonostachys rósea*. (a) Conidióforos verticilados (escala = 100 μm); (b) Conidióforos penicilados (escala = 10 μm); (c) Esporos (escala = 10 μm); (d) Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de conidióforos penicilados (escala = 10 μm); (e) MEV de uma massa de esporos em um conidióforo penicilado (escala = 15 μm) e (f) MEV de esporos (escala = 3 μm).



Fonte: OKUDA et al, 2000.

Um aspecto relevante desses fungos é a forma de interação com o ambiente, pois tais fungos possuem a capacidade de produção de metabólitos secundários, o qual auxiliam na sua manutenção, por estarem relacionados à competição, simbiose, auto proteção, entre outros aspectos (MACHELEIDT et al, 2016; ZEILINGER et al, 2016). É possível que a produção destes metabólitos secundários atue em sinergia com a produção de enzimas hidrolíticas nestes diversos processos celulares (ZEILINGER et al, 2016).

Os metabólitos secundários são variados quanto à sua natureza química, um exemplo são os polissacarídeos. Silva et al. (2006), e Viccini (2009) demonstraram a presença de diversos polissacarídeos produzidos por esses fungos, que apresentaram atividades biológicas, podendo ser aplicáveis satisfatoriamente nas áreas industrial e médica (SILVA et al, 2006).

As enzimas hidrolíticas produzidas por *Clonostachys* são pouco exploradas na literatura. As mais estudadas são as proteases, por estarem relacionadas à patogenicidade em nematoides (ZHAO, et al, 2005; LI, et al., 2006; LIANG et al., 2011). Outras enzimas hidrolíticas produzidas por *C. rosea* foram relatadas em estudos como estando relacionadas ao processo de lise celular de fungos fitopatogênicos, como a quitinase, e a β -1,3-glucanase (CHATTERTON e PUNJA, 2009). Em outro estudo, Gomes et al. (2017) identificaram a produção de enzimas lignocelulolíticas no secretoma de *C. byssicola*.

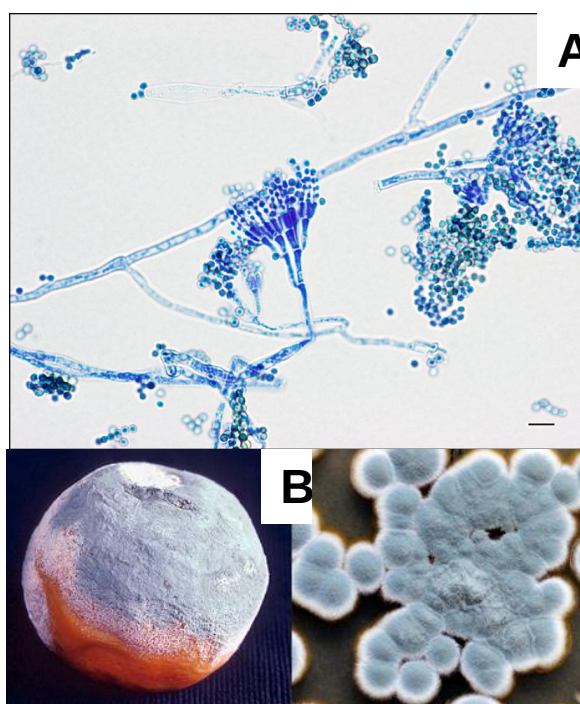
Mesmo existindo estudos que comprovam a expressão de enzimas hidrolíticas dessas espécies, há poucos estudos que direcionem a atenção à produção destas enzimas, que possuem diversas aplicabilidades industriais e biotecnológicas.

2.4 *Penicillium* sp.

Penicillium spp. é um gênero de fungos filamentosos ubíquos, encontrados em diversos habitats, com solo, ar, produtos alimentares, interiores de ambientes, entre outros (MOURA, 2015) (Figura 3B). São comumente isolados em tecidos vegetais em decomposição no solo, mas também podem ser patógenos pré e pós-colheita de culturas alimentares. Por essa razão são considerados organismos endofíticos, sendo esta a sua principal função na natureza (SAMSON e FRISVAD, 2011). São classificados como pertencente ao Filo Ascomycota, subfilo Pezizomycotina, classe

Eurotomyces e ordem Eurotiales, pertencentes à família Trichocomanaceae, com sua fase teleomófica (ciclo sexual) pertencente aos gêneros *Eupenicillium* ou *Talaromyces* (PALLU, 2010). Este gênero apresenta conidióforos ramificados que sustentam as fiálides, de onde se originam os conídios unicelulares, com estrutura esférica, elíptica ou oval (KIMATI et al., 1997) (Figura 3A).

Figura 3. *Penicillium* spp. (A) Microscopia. (B) Cultura.



Fonte: (A) D'HALEWYN e CHEVALIER, 2016. (B) UNIVERSIDAD OF ADELAIDE, 2020.

Os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* spp. possuem grande impacto econômico. Historicamente o exemplo mais difundido do uso de bioativos de *Penicillium* spp. é da produção do e antibiótico penicilina, o qual ainda possui grande importância para indústria farmacêutica e médica, em razão da sua ação no combate a agentes infecciosos (SILVA et al., 2011), a exemplo dos estreptococos, os pneumococos, os gonococos, os meningococos e os bacilos da difteria e da gangrena gasosa (PEREIRA, 2018). A grande capacidade de produção de metabólitos secundários biologicamente ativos, peptídeos e enzimas extracelulares, faz com que esse grupo de fungos demonstre enorme potencial biotecnológico, na área farmacêutica (LI et al., 2005; NICOLETTI et al., 2008), controle biológico (GUIJARRO et al., 2008; PALLU, 2010) e produção alimentícia, com enfoque no

uso de algumas espécies na produção de queijos do tipo Camembert e Roquefort (GIRAUD et al., 2010). Constata-se também a potencialidade destes fungos para a produção de enzimas hidrolíticas em escala industrial (MANDALARI et al. 2008), com destaque as proteases e outras enzimas de interesse biotecnológico (IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2007).

2.5 *Beauveria brongniartii*

Beauveria brongniartii é um fungo entomopatogênico utilizado como controle biológico de insetos-praga desde a sua primeira descrição (ZIMMERMANN, 2007). Atualmente é um patógeno fúngico promissor, virulento contra diferentes espécies de insetos (HU et al., 2010; WADA et al., 2011; FAN et al., 2013; WADA et al., 2016; YU et al., 2017). A sua distribuição é bem ampla, sendo encontrado em insetos e diferentes habitats (SUN e LIU, 2008). Características como: maior tolerância ambiental, alta capacidade de infecção e persistência, faz com esse gênero se destaque entre os agentes de biocontroles (WU et al., 2019).

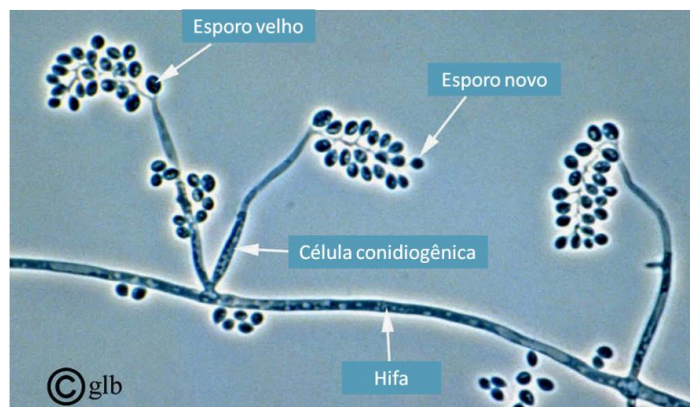
O gênero *Beauveria* possui fungos que apresentam colônias brancas, amareladas, rosadas ou avermelhadas (Figura 4). O verso é geralmente incolor ou amarelado. Os conídios são hialinos, elipsoides, que exibem uma parte basal subglobosa ou em forma de balão. Podem ser encontrados agrupados, organizados em pequenos grupos, ou individualizados (ZIMMERMANN, 2007) (Figura 5).

Figura 4. Crescimento em placa de Petri, contendo meio Ágar-Sabouraud-Dextrose de *Beauveria brongniartii*.



Fonte: Autora

Figura 5. Descrição morfológica de *Beauveria bassiana*.



Fonte: Simonazzi et al (2015) adaptado.

O processo de infecção da *B. brongniartii* em seus hospedeiros é caracterizado pela penetração do fungo na cutícula do inseto, por eventos combinados de produção de metabólitos secundários, enzimas extracelulares e ação mecânica provocada pela disseminação das hifas (FAN et al., 2013). Uma dessas enzimas é a protease, sendo esta, uma espécie que possui a capacidade de ser uma fonte desta enzima, e estudos como esse podem propor informações relevantes quanto a capacidade de produção enzimática e a características dessa enzima, visando a utilização em processos biotecnológicos.

2.6 Proteases e aplicações

As proteases ou peptidases são enzimas ubíquas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas (CO-NH) de proteínas, resultando em peptídeos ou aminoácidos livres (RAO et al., 1998; SOUZA et al., 2015). A clivagem proteolítica de peptídeos é uma das mais frequentes e importantes modificações de proteínas, deste modo, proteases digestivas são as enzimas bem mais caracterizadas em nível de função e estrutura, gerando um conhecimento geral acerca das peptidases (TREMACOLDI, 2009).

As proteases podem ser classificadas de acordo com a fonte, tamanho molecular, pH, carga elétrica, ação catalítica (endo ou exopeptidases), ou especificidade ao substrato (SHARMA et al., 2017). Devido a esta grande diversidade de possíveis classificações, um sistema mais razoável foi recomendado pela *Enzyme Commission* (EC), segundo qual são divididas em classes de Endopeptidases, que atuam internamente nas cadeias polipeptídicas e

Exopeptidases, as que atuam apenas próximo ao terminal de uma cadeia polipeptídica (GRASSMANN e DYCKERHOFF, 1928).

Para o estabelecimento da nomenclatura das proteases, além dos parâmetros de conformação da cadeia polipeptídica do substrato e natureza dos vários resíduos de aminoácidos em torno da ligação peptídica a ser hidrolisada, têm-se também o critério adicional do mecanismo catalítico (NEURATH, 1986). As subclasses de exopeptidases, mesmo atuando nas extremidades das cadeias polipeptídicas, são distinguíveis conforme a região de atuação. Existem exopeptidases que atuam no terminal N (amino), liberando um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases; EC 3.4.11), ou um dipeptídeo ou um tripeptídeo (dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases; EC 3.4.14). Já outras que atuam no terminal C (carboxil) livre, liberando um único resíduo (carboxipeptidases, EC 3.4.16-18) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases; EC 3.4.15). Dentro da subclasse das carboxipeptidases são encontrados três grupos, que são designados com base no mecanismo catalítico: as carboxipeptidases do tipo serina (EC 3.4.16), as metalocarboxipeptidases (EC 3.4.17) e as carboxipeptidases do tipo cisteína (EC 3.4.18). Já a classe das endopeptidases possuem sub-classes com base no mecanismo catalítico: serina endopeptidases (EC 3.4.21), cisteína endopeptidases (EC 3.4.22), endopeptidases aspárticas (EC 3.4.23), metaloendopeptidases (EC 3.4.24) e treonina endopeptidases (EC 3.4.25) (SUMANTHA, LARROCHE & PANDEY, 2006) (IUBMB, 2019) (Quadro 1).

Quadro 1. Classificação das Proteases

Classe	Sub-classe	
Exopeptidases	Atuam no terminal N	
	aminopeptidases	EC 3.4.11
	dipeptidil-peptidases e tripeptidil-peptidases	EC 3.4.14
	Atuam no terminal C	
	peptidil-dipeptidases EC 3.4.15	
	carboxipeptidases EC 3.4.16-18	carboxipeptidases do tipo serina EC 3.4.16
		metallocarboxipeptidases EC 3.4.17
		carboxipeptidases do tipo cisteína EC 3.4.18
Endopeptidases	serina endopeptidases EC 3.4.21	
	cisteína endopeptidases EC 3.4.22	
	endopeptidases aspárticas EC 3.4.23	
	metaloendopeptidases EC 3.4.24	
	treonina endopeptidases EC 3.4.25	

Fonte: Autor

As peptidases representam um dos grupos mais importantes de enzimas comerciais e industriais. Durante séculos, as enzimas foram envolvidas em diversos processos antigos de fermentação. Principalmente as de origem microbiana, foram empregadas na panificação, fabricação de cerveja, produção de álcool, queijo, entre outros (WARD, RAO e KULKARNI, 2009). Hoje, os avanços analíticos promoveram uma variedade de funções, sendo atualmente considerados biocatalisadores de alta relevância em processos biotecnológicos (SHARMA et al., 2017). Dentro do mercado de enzimas, as proteases microbianas se destacam, conforme descrito por Pant et al. (2015), as principais enzimas produzidas por fontes microbianas, de interesse comercial são as proteases. Desta maneira o mercado de enzimas industriais começou a ampliar-se com a comercialização de proteases alcalinas para o uso em detergentes (RAO et al., 1998). No cenário atual, a indústria enzimática

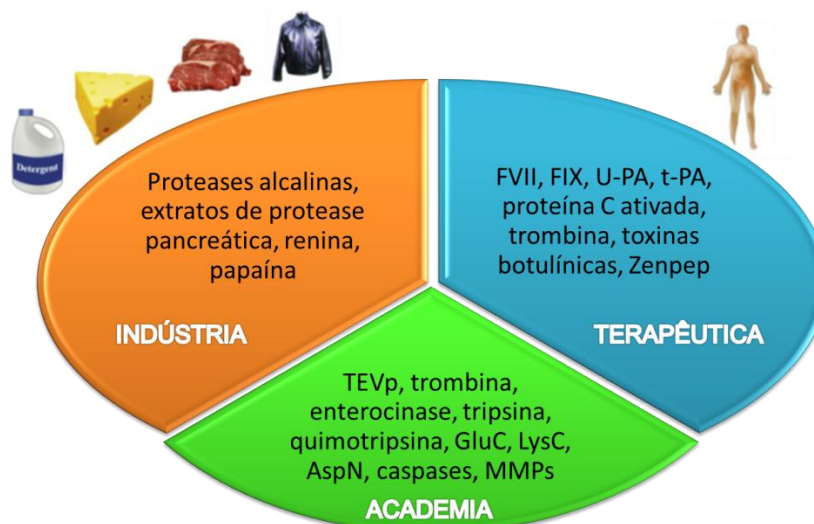
apresenta números crescentes de produção e comercialização a cada ano. Relatórios do mercado de enzimas estima US \$ 5,9 bilhões em 2020, e a projeção é que a taxa de crescimento anual composta (CAGR) cresça 6,5%, o que fará atingir valores de US \$ 8,7 bilhões em 2026 (MARKET AND MARKETS, 2020). Nessa esfera mercadológica, as proteases representam 60% do total das vendas globais de enzimas e compõe o maior grupo de enzimas industriais (NINGTHOUJAM et al., 2009).

As proteases alcalinas começaram a ser exploradas ao longo do tempo, e diversos microrganismos foram estudados com vistas a serem usados como potenciais biofábricas destes biocatalisadores (AGUILAR, DE CASTRO e SATO, 2019). Para aplicação industrial, as proteases necessitam ter algumas características distintivas: manter a atividade em condições um tanto hostis, que compreende alta temperatura, variações de pH e presença de inibidores e agentes oxidantes (SHARMA et al., 2017).

Proteases de fonte microbiana possuem vantagens por possuírem características altamente atrativas para os processos industriais biotecnológicos, como baixo custo de produção, boa estabilidade e especificidade, período de produção relativamente curto, fácil regulação do produto desejado, alta produtividade, métodos de fermentação consolidados, podendo ser capaz de produzir hidrolisados que também podem ser explorados comercialmente (SUMANTHA; LARROCHE; PANDEY, 2006; SHARMA et al., 2017; DOS SANTOS AGUILAR e SATO, 2018).

A crescente produção, alavancada pela contínua demanda de enzimas mais robustas, tem como finalidade fornecer mais biocatalizadores de características cada vez mais vantajosas para o segmento farmacêutico (SUETSUNA, 1998), alimentício (KONG, ZHOU e QIAN, 2007), produção de química fina (CONTESINI, 2014), produção de bioetanol (PÉREZ-CARRILLO et al., 2008), indústrias de detergentes (RAO et al., 1998), de couro (SINGH et al., 2016), entre outros (GARCÍA-REYES et al., 2017) (Figura 6).

Figura 6. Uma visão global das aplicações das proteases.



Fonte: Li et al. (2013), adaptado.

2.7 Processo de produção de enzimas

Fermentação é uma ocorrência fisiológica de uma célula viva atribuída ao catabolismo de matéria orgânica, como gorduras, carboidratos e proteínas; via reações agregadas, mediadas por enzimas, promovendo a formação de compostos intermediários e produtos finais da oxidação biológica total, e seus derivados (REGULY, 1996). Já no aspecto tecnológico, a fermentação consiste num processo de utilização do metabolismo de microrganismos, sobre um substrato orgânico, com vistas à produção de substâncias ou modificação do substrato de maior valor agregado. Exemplos de substâncias oriundas de processos metabólicos: solventes, ácidos orgânicos, biopolímeros, enzimas, hormônios, bebidas alcoólicas, entre outros (ROVEDA et al., 2007).

Os processos fermentativos podem substituir satisfatoriamente processos estritamente químicos, de síntese orgânica, no entanto é necessário ater-se a informações como: a capacidade do agente biológico (microrganismo ou enzima) a ser utilizado, o rendimento econômico do produto, a capacidade da utilização de um substrato barato e de disponibilidade favorável, facilidade de recuperação ou obtenção, pureza, e por fim, a impossibilidade ou inviabilidade de se obter o produto por outro processo (REGULY, 1996).

O processo fermentativo industrial consiste em duas etapas principais: A etapa *upstream* (pré-tratamento da matéria-prima), que caracteriza as fases de pré-fermentação, o estabelecimento das condições de cultivo para o processo; e a etapa

downstream (obtenção do produto) em que têm-se a união das fases de extração e purificação dos produtos e subprodutos obtidos (BORZANI et al., 2001).

Na produção por fermentação há a introdução do agente biológico no meio de cultivo. Sendo este um microrganismo, a forma de inserção é como um inóculo, que segundo DE ALMEIDA LIMA (2001), é o volume de suspensão de concentração adequada de células microbianas, capaz de garantir a fermentação de um dado volume de mosto. No processo de produção fermentativa, a escolha do microrganismo é de extrema relevância para uma eficiente e satisfatória produção (SCHMIDELL et al., 2001). Logo, o aspecto da preservação dos micro-organismo ao longo do tempo é um ponto importante e pré-requisito básico para o processo. Dentre as técnicas de preservação utilizadas pontuam-se: o armazenamento em baixa temperatura (2 °C a 6 °C), combinada ou não à preservação em ágar inclinado; armazenamento por congelamento (-18°C a -80 °C); e liofilização, considerada a melhor técnica de preservação (CRUEGER; CRUEGER, 1993).

2.7.1 Fermentação Submersa

Dos processos fermentativos existentes, um deles é a fermentação submersa (FS), que tem como aspecto principal a utilização de um meio de cultivo líquido com nutrientes em solução (ALONSO, 2001). Tal processo foi amplamente difundido durante a segunda guerra mundial, em razão da produção do antibiótico recentemente descoberto naquela época, a penicilina. Para produção em larga escala fez-se necessária a realização de diversos estudos visando conhecer a cinética destes processos, os dados de dimensionamento e o controle de biorreatores (PANDEY, SOCCOL e MITCHELL, 2000).

Durante o processo de fermentação é necessário avaliar diversos parâmetros importantes, dos quais os principais são: agitação, temperatura, aeração e pressão (CRUEGER; CRUEGER, 1993). E também algumas variáveis necessitam ser avaliadas e controladas, as quais destacam-se as: temperatura, pH, pressão e concentração de oxigênio, pois tais medidas podem refletir num máximo rendimento e garantir um sucesso ao processo (BORZANI et al., 2001).

A fermentação submersa possui algumas características que conferem vantagens e desvantagens (PINTO, 2008). Apresenta uma relativa facilidade no controle dos parâmetros já mencionados, sobretudo se monitorados por sensores

adequados. Contudo, tal processo possui maior probabilidade de contaminação, pelo volume de água no meio, e também, os produtos extracelulares encontram-se significativamente diluídos o que limita a sua obtenção nas etapas de purificação (COUTO e SANROMÁN, 2006).

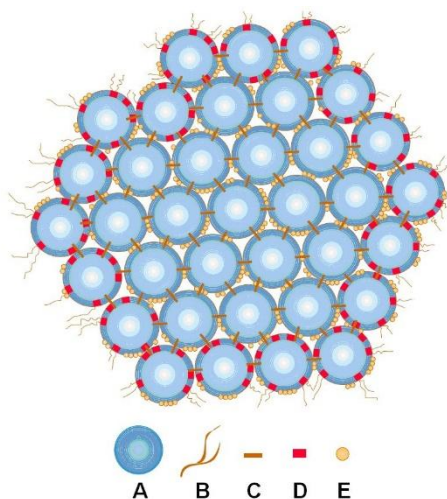
O meio de cultivo escolhido para ser utilizado na FS deve conter basicamente fontes de carbono e de nitrogênio, sais minerais e fatores de crescimento. E mais especificamente, para a produção de enzimas, outro componente importante é a presença de um indutor, exemplo, amido para a indução de enzimas amilolíticas (ROVEDA et al., 2007). Outro aspecto de grande relevância é o inóculo, o microrganismo a ser selecionado para o processo de produção, pois este é de grande importância para o sucesso da produção em larga escala. Seu arcabouço genético deve ser favorável à geração do produto de interesse, ou seja, em se tratando de biofábricas para produção de enzimas, o microrganismo a ser inserido no processo necessita possuir a capacidade de expressão da enzima desejada, como também o seu local de isolamento pode inferir grandes atribuições ao tipo de expressão proteica, induzindo características únicas, que podem ser vantajosas a indústria (ROVEDA et al., 2007).

2.7.2 Leite desnatado como substrato alternativo

O leite é uma fonte nutricional proteica. É composto de água, 87,3% e sólidos totais, 12,7%. Dos quais, aproximadamente 3,5% são de proteína totais, que corresponde a caseína (80%) e proteínas do soro do leite (20%), β -lactoglobulina, α -lactalbumina e outras, com diversas atividades biológicas (MOHANTY et al., 2016). Além de proteínas, a parte sólida consiste também 3,5% de gordura (sendo este o leite integral), 3,8% de lactose, 4,9% de minerais e 0,7% de vitaminas (SGARBIERI, 2005). No leite também há a presença de diversos peptídeos, com propriedades biológicas multifuncionais (KITTS e WEILER, 2003), variando quanto à sequência de aminoácidos existente, podendo possuir de dois a vinte resíduos de aminoácidos (FITZGERALD e MEISEL, 2003). São mais de vinte compostos metálicos diferentes que podem ser vistos no leite, incluindo cobre, zinco, manganês e ferro (SOMER, 1974). Tais metais são cofatores de diversas enzimas, desempenhando assim um papel importante em várias funções biológicas (GASMALLA et al., 2013).

As proteínas presentes no leite são veículos naturais de micronutrientes, como cálcio e fósforo, mas também de aminoácidos e algumas moléculas imunológicas (imunoglobulinas e lactoferrina) (LIVNEY, 2010). Essa propriedade é atribuída à caseína, uma proteína anfipática (MCMAHON e OOMMEN, 2013) com sequências fosforiladas, que possibilitam a interação com o fosfato de cálcio, produzindo assim, minúsculos agrupamentos de íons circundados por uma camada de proteína (HOLT, 2004). Em torno de 95% das caseínas do leite, em razão da sua característica anfipática, formam coloides, denominadas micelas (Figura 7), responsáveis pela estabilidade térmica do leite (FOX e BRODKORB, 2008), um fator importante que garante adequadas condições de processamento. A formação de micelas de caseína no leite também confere a sua insolubilidade em água. Existem quatro estruturas distintas de caseína: α_{s1} -caseína (38%), α_{s2} -caseína (10%), β -caseína (35%) e κ -caseína (15%) (BRASIL et al., 2015). A parte interna das micelas é constituída predominantemente α_{s1} -, α_{s2} -, β -caseína e de nanopartículas de fosfato de cálcio coloidal, enquanto que na superfície, preferencialmente encontra-se κ -caseína (DALGLEISH, 2011).

Figura 7. Micela de caseína (A: submicela, B: cadeias protéicas, C: fosfato de cálcio, D: κ -caseína, E: grupo fosfato).



Fonte: Wageningen University, 2020.

As propriedades do leite elencadas nessa revisão demonstram a potencialidade dessa matéria-prima para uso em bioprocessos, pois suas características nutricionais e físico-químicas favorecem o crescimento microbiano e a produção de bioprodutos de interesse biotecnológico, a semelhança dos meios de cultivo comerciais já consolidados como meios indutores enzimáticos (ATLAS,

2010). Em trabalhos que relatam a produção de proteases microbianas, a caseína é acrescida ao meio mínimo como substrato enzimático para o favorecimento da produção de enzimas proteolíticas de fungos filamentosos (CHELLAPANDI, 2010). À vista disso, a utilização do leite, além de abranger as qualidades nutricionais e indutivas dos meios de cultura padrão para protease, também é uma fonte de produção mais barata e acessível visando à produção, e tais estudos promovem informações relevantes para a indústria de diferentes áreas que utilizam enzimas proteolíticas.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de proteases por quatro fungos filamentosos (*Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Clonostachys* sp.), por fermentação submersa utilizando como substrato alternativo o leite desnatado.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar o leite como potencial indutor de proteases;
- Extrair e purificar enzimas proteolíticas produzidas pelos isolados fúngicos;
- Caracterizar a protease quanto a: classe, temperatura ótima; termoestabilidade; e cinética enzimática.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal (LGM BIOTEC), e no Laboratório de Biotecnologia de Organismos Aquáticos (LABOrA) do Centro de Biotecnologia – CBIOTEC – UFPB.

4.1 Coleta e isolamento dos fungos do aquário de peixe zebra

4.1.1 Meio de cultura

Foi utilizado como meio para crescimento das colônias fúngicas o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose 4%, constituído de peptona (10 g/L), dextrose (40 g/L), ágar (15 g/L) e pH 5,6. O meio foi autoclavado conforme as instruções do fabricante.

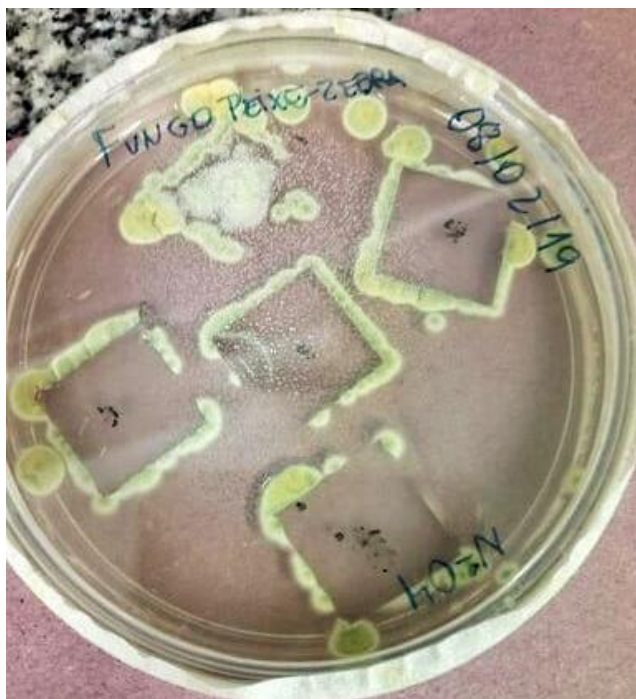
4.1.2 Caracterização dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra

Uma alíquota de 1mL de água foi retirada do tanque de cultivo de peixes-zebra (*Danio rerio*) do laboratório de Biotecnologia de Organismos aquáticos (LABOrA). No tanque continha ovos de peixe-zebra inviáveis, em razão da presença de micélios fúngicos. A água apresentava salinidade entre 0,2 e 0,5 g/L, temperatura entre 25 e 28 °C e pH entre 6,2 e 7,8. A alíquota de 1 mL foi inoculada em uma placa de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, para promover o crescimento de culturas fúngicas, presentes nesse ambiente. Após o crescimento das diversas colônias, um fragmento de cada colônia foi retirado para o isolamento e individualização em nova placa de Petri em temperatura ambiente por 120 horas.

4.1.3 Cultura em lamínula

Fragmentos dos isolados fúngicos foram inoculados em quatro pontos distintos sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contidos em placas de Petri e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após 24 horas de incubação, as lamínulas foram tiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante azul de metileno e observada ao microscópio óptico para identificação dos diferentes isolados fúngicos (RIDDELL, 1950). O experimento foi conduzido por 96 horas (Figura 8).

Figura 8. Placa de Petri com cultura em lamínula.



Fonte: Autora.

4.1.4 Identificação dos isolados fúngicos

A análise foi feita mediante a avaliação dos dados macroscópicos, obtidos a partir da observação direta da colônia fúngica e dos dados microscópicos com o auxílio do microscópio óptico Prolab® (ALEXOPOULOS et al., 1996; BUCKINGHAAM e HANSELL, 2003).

4.1.5 Manutenção das linhagens fúngicas

As amostras foram repicadas em tubos de ensaio contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose, e incubadas à temperatura ambiente durante 15 dias. Após o cultivo os isolados foram mantidos sob refrigeração à 4 °C.

4.1.6 Isolados fúngicos

Foram utilizados quatro isolados fúngicos para a produção de proteases por fermentação submersa, utilizando leite desnatado com substrato, descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Origem dos isolados

Isolados	Substrato de isolamento/Origem	Local de depósito
<i>Paecilomyces</i> sp. TP08	Óleo diesel/Posto de gasolina /João Pessoa/ PB - 2014	Cedido pela Coleção de cultura do laboratório LAMA
<i>Beauveria brongniartii</i> URM 6504	Solo de sistema agroflorestal/Abreu e Lima/PE - 2011	Cedido pela micoteca URM da UFPE
<i>Penicillium</i> sp.	Ovos de peixe-zebra/João Pessoa - UFPB / PB - 2019	Isolado, identificado e depositado na coleção de cultura do LGM - BIOTEC
<i>Clonostachys</i> sp.	Ovos de peixe-zebra/João Pessoa - UFPB / PB - 2019	Isolado, identificado e depositado na coleção de cultura do LGM - BIOTEC

Fonte: Autora

4.1.7 Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos do aquário de peixe-zebra

Para determinar a atividade enzimática seguiu a metodologia descrita por Dingle et al. (1953), conforme citado por Fernandes (2009). Os isolados do tanque foram inoculados em placa de petri contendo o meio ágar-leite-gelatina. (Tabela 2).

Tabela 2. Composição meio Ágar-Leite-Gelatina.

Ágar-Leite-Gelatina
Ágar (1,8%)
Gelatina (1,0%)
Leite Desnatado (1,0%)
Tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5 (400mL)

Fonte: Autora

O ágar foi adicionado em 400 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M, pH 5, homogeneizado e esterilizado a 1 atm, 120°C por 20 minutos.

Para a solução de gelatina a 10%, adicionou-se 5 gramas de gelatina em 50 mL de solução tampão citrato-fosfato. A solução foi aquecida em banho-maria para a dissolução completa da gelatina e, posteriormente esterilizado por autoclavação.

Para solução de leite desnatado a 10% foram dissolvidas 5 gramas de leite desnatado em 50 mL de tampão citrato-fosfato, posteriormente a solução foi homogeneizada e esterilizada nas mesmas condições para as outras etapas do meio.

As soluções de ágar, gelatina e leite desnatado em tampão citrato-fosfato esterelizadas foram misturadas com cuidados assépticos para a obtenção de 500 mL de meio Ágar Gelatina-Leite, o meio preparado foi vertido em placas de petri.

Os cultivos foram mantidos em bancada, durante 7 dias à 28°C. Após esse período as placas foram analisadas e os fungos produtores de proteases foram confirmados com a formação e visualização de um halo ao redor das colônias.

4.2 Produção enzimática

4.2.1 Produção de conídios

Os fungos foram inoculados em meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose para conidiogênese (esporulação) (Em seguida, as placas foram deixadas em temperatura ambiente ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), por um período de 10 a 15 dias. Após esse período, os conídios foram coletados, raspando-se a superfície do meio de cultura e transferindo-a para tubos de centrífuga (50 mL) para o preparo da suspensão contendo uma solução com água destilada + “tween” 80 a 0,01 %. Em seguida, foi estimada a concentração dos conídios em câmaras de Neubauer e as suspensões foram padronizadas em 1×10^9 conídios/mL.

4.2.2 Produção enzimática em fermentação submersa

O experimento foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de leite Molico[®] Líquido (5%), (Quadro 2), diluído em água destilada, com pH final de 7,2. Os frascos foram autoclavados a 1 atm e 120° C por 20 minutos. Cada frasco foi inoculado com 0,5 mL da suspensão de conídios (1×10^9 conídios/mL) e incubado a $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 dias e 180 rpm (Figura 9). Foi realizado um experimento com três repetições.

Quadro 2. Composição nutricional do leite Molico®.

Informação nutricional	
Porção de 20g	
Quantidade por porção	
Açúcares	10g
Proteínas	6,5 g
Gorduras totais	0 g
Sódio	102 mg
Cálcio	500 mg
Ferro	2,7mg
Magnésio	49 mg
Vitamina A	113 µg
Vitamina 1d	1,5 µg
Vitamina C	8,6 mg
Vitamina B1	0,23 mg
Vitamina B3	3,0 mg
Vitamina B6	0,25 mg
Vitamina B12	0,46 µg
Vitamina B5	0,95 mg
Vitamina B7	5,7 µg

Fonte: Autora

Figura 9. Frascos de Erlenmeyer contendo meio leite fermentado pelos fungos *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Clonostachys* sp, após 120 horas de incubação.

Fonte: Autora

4.2.3 Extração enzimática

Após o período de fermentação estabelecido, foi realizada a filtração a vácuo para a obtenção do extrato bruto enzimático.

4.2.4 Análise da atividade enzimática

A atividade das proteases foi analisada utilizando como substrato a azocaseína 1%, conforme a metodologia descrita por Charney e Tomarelli (1947). Dessa forma, foi adicionado 50 µL do substrato (azocaseína 10 mg/mL) em 30 µL do filtrado. A mistura reacional foi incubada a 37 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida adicionando 240 µL de ácido tricloacético (TCA) 10 %, por 15 minutos. Após a centrifugação 10.000 g por 5 minutos, foi adicionado 130 µL de NaOH 1,8N ao volume de 70 µL do sobrenadante. Essa mistura foi colocada em placas de 96 poços para a realização da leitura da amostra, que foi realizada no comprimento de onda igual a 450 nm. Uma unidade enzimática é definida como a quantidade de enzima necessária para aumentar a absorbância em 0,001 a 450 nm nas condições de tempo e temperatura de incubação do teste (GIONGO, 2006). O branco foi feito adicionando água destilada no lugar da amostra. Todas as análises de atividade enzimática foram realizadas em triplicata

4.3 Purificação

4.3.1 Precipitação com etanol

Inicialmente foi realizada a centrifugação do extrato bruto a 10.000 rpm, 4 °C, por 10 minutos, para obtenção remoção das estruturas fúngicas e obtenção de um sobrenadante contendo apenas as moléculas solúveis (chamado neste estudo de extrato bruto). Após isso, foram adicionados dois volumes distintos de etanol resfriado à cultura, para obtenção das frações 0-30% e 30-80%. Os volumes utilizados foram calculados conforme a Equação 1. Para obtenção de cada fração, a mistura do extrato com o respectivo volume de etanol foi mantida durante 24h, sob refrigeração. Logo após foi realizada a centrifugação, nas mesmas condições da obtenção da fração inicial. Ao final do processo foram separadas as frações: inicial ou extrato bruto; fração 0-30%; fração 30-80%; e sobrenadante final para realização das análises de atividade enzimática (item 4.2.4).

$$Volume\ a\ ser\ adicionado = \frac{Volume\ inicial \times (porcentagem\ final - inicial)}{concentração\ inicial\ do\ etanol - (porcentagem\ final)} \quad \text{Eq. (1)}$$

4.3.2 Cromatografia por Troca iônica

Após realização da etapa de precipitação com etanol, a fração que demonstrou maior atividade de hidrólise peptídica foi submetida ao processo de purificação por cromatografia por troca iônica. Para isso foi utilizada uma resina catiônica, DEAE-Celulose (Sigma-Aldrich). O fluxo da coluna foi de 1mL/min utilizando Tris-HCl 0,1M pH 8,0 como fase móvel, e o eluente foi coletado (1mL por tubo) e analisado em um espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 280, 260 e 214 nm. Inicialmente lavou-se a coluna com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (50mL) para a estabilização da absorbância. Logo depois foi adicionado 8mL da amostra, a fração 30-80%, a qual se observou maior atividade enzimática. As proteínas da amostra não ligadas a resina foram eluídas com o tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0 (50mL), até a estabilização da absorbância. Os próximos passos consistiram em adição de soluções da fase móvel adicionadas de diferentes concentrações de NaCl para que, através da força iônica, houvesse a competição com a ligação da proteína à resina, desestabilizando essa interação para ocorrer a eluição e consequentemente a separação das diferentes proteínas da amostra. As soluções utilizadas foram Tris-HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 0,1M; Tris-HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 0,3M; Tris-HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 0,7M; e Tris-HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 1M, todas no volume de 50mL.

4.4 Caracterização das proteases

4.4.1 Inibidores de serino-protease

A caracterização da classe enzimática foi realizada utilizando testes com inibidores de serino-protease. Deste modo, foram utilizados quatro inibidores específicos: fluoreto de fenil-metil-sulfonil (PMSF, um inibidor irreversível de serino-proteases), tosil-L-lisil-clorometano (TLCK, um inibidor irreversível de tripsinas), tosil-L-fenilalanil-clorometano (TPCK, um inibidor irreversível de quimotripsinas), e benzamidina (um inibidor competitivo de tripsinas). Todos estes foram dissolvidos em DMSO devido ao caráter hidrofóbico destas moléculas. O ensaio consistiu na adição de 3µL da solução dos inibidores a 10 mM em DMSO, em 27µL da enzima produzida, seguido de incubação em temperatura ambiente por 15min. Após o

tempo de reação, foram realizados o teste de atividade conforme descrito no item 4.2.4. A tripsina bovina foi utilizada como controle positivo.

4.4.2 Análise da temperatura ótima e termoestabilidade

Para a análise de qual temperatura a protease produzida obteria uma maior atividade, as amostras foram incubadas com o substrato cromogênico da protease, em diferentes temperaturas (25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 °C). Já para a termoestabilidade, após os dados obtidos no teste de temperatura ótima, foram selecionadas as temperaturas: 25, 35, 40 e 45 °C. As amostras permaneceram nestas temperaturas durante 5h, com retiradas de pontos a cada hora. Logo após esses processos seguiu-se o protocolo de análise da atividade enzimática (item 4.2.4). As amostras utilizadas foram o extrato enzimático bruto e o purificado, e os resultados obtidos foram comparados.

4.4.3 Cinética enzimática

A cinética da digestão enzimática foi avaliada durante 60 minutos usando a concentração do substrato em uma faixa de 0,1 a 3,0% (p/v) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, seguindo posteriormente o protocolo estabelecido nesse estudo para análise da atividade enzimática (item 4.2.4).

4.5 Análise estatística

Os gráficos foram gerados utilizando os programas Origin 8 Pro e Excel. As médias foram comparadas utilizando o teste de ANOVA, após verificação da distribuição normal dos dados, seguidos pelo teste *post-hoc* de Tukey, sendo consideradas diferenças significantes no nível de 95%, com o auxílio do *software* SPSS.

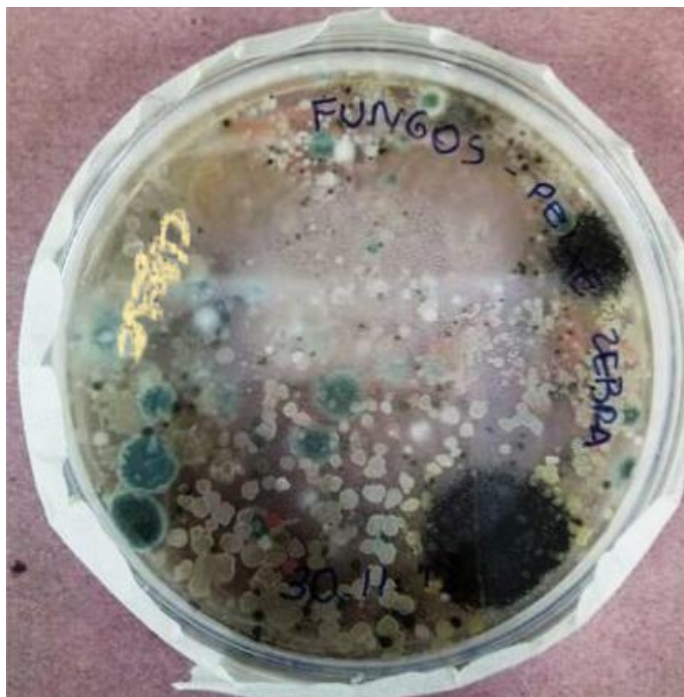
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra

5.1.1 Coleta e isolamento dos fungos do aquário de peixe zebra

Com a amostra da água do tanque de peixe-zebra foi possível observar o crescimento de várias colônias, de fungos filamentosos e também leveduriformes (Figura 10). As colônias de fungos filamentosos crescidas após o período de incubação em temperatura ambiente ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$) foram individualizadas em novas placas de Petri.

Figura 10. Colônias de fungos obtidas da amostra de água do aquário de peixe-zebra, após 5 dias de crescimento à $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.



Fonte: Autora.

5.1.2 Identificação macroscópica e microscópica dos isolados fúngicos coletados do aquário de peixe-zebra

Os isolados de *Paecilomyces* sp. e *Beauveria brongniartii* foram analisados e caracterizados anteriormente por equipes do laboratório de Biologia Vegetal (LGM - BIOTEC) (SILVA, 2018; BEZERRA, 2018).

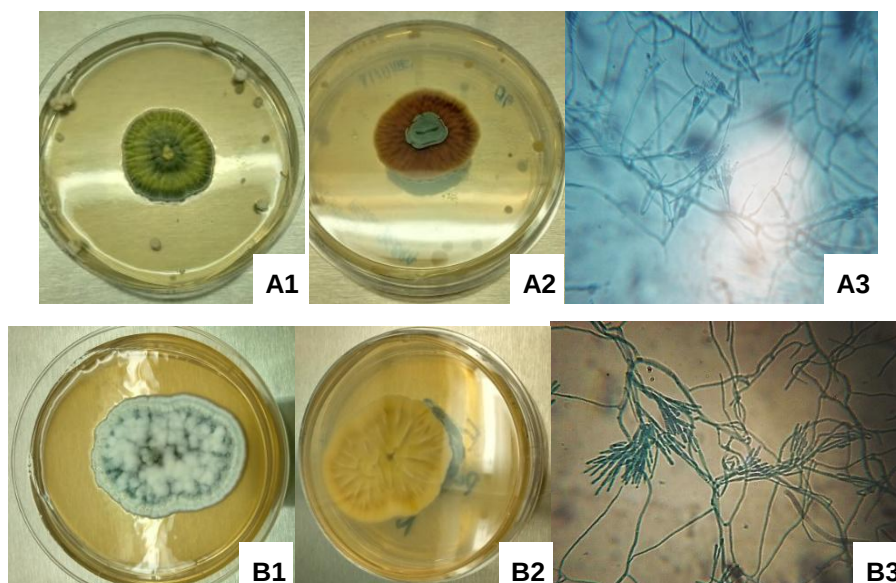
Para identificar o gênero dos isolados fúngicos que estavam no ambiente do aquário, realizou-se análises macroscópicas dos caracteres fenotípicos das colônias

e análises microscópicas dos aspectos morfológicos de isolados fúngicos (Figura 11). Foram identificados dois isolados pertencentes ao gênero *Penicillium* sp., um pertencente ao gênero *Clonostachys* sp. e outro ao *Cladosporium* sp.. A identificação foi consolidada em razão da presença de características específicas do gênero.

A colônia de *Penicillium* sp. apresentou um crescimento lento, radial, de aspecto enrugado e aveludado, com parte vegetativa de pigmentação verde e conídios acima, de cor amarelo-esverdeado (Figura 11.A1). No verso, uma pigmentação mais escura, de tom amarronzado, e apresentando micélios aprofundados (Figura 11.A2). A microscopia da cultura em lamínula de *Penicillium* sp. revelou estruturas de hifas, caracterizado pelo tecido vegetativo que forma o micélio, e também algumas estruturas de hifas diferenciadas, os conidióforos, que dão sustentação as fiálides, as quais encontram-se fileiras de conídios de formato circular (Figura 11.A3), tais apresentações celulares estão de acordo aos estudos de Zapata, (2005).

Outro fungo filamentoso isolado na amostra de água do aquário foi o *Clonostachys* sp. O crescimento radial em placa de Petri forneceu dados macroscópicos da colônia, em que observada uma cultura de crescimento lento, de cor esbranquiçada, de consistência úmida, com aspecto micelial algodanoso, com elevações, e presença de conídios esverdeados, espalhados em diversas regiões da colônia, de apresentação pulverulenta e seca. No verso, foi possível encontrar complexo de hifas formando dobras, de pigmentação esbranquiçada. A microscopia apresentou hifas septadas, com presença de conidióforos penicilados e conídios em cadeias, de formato assimétrico. Tais estruturas celulares são condizentes ao gênero *Clonostachys*, o qual foi também relatado por Moreira (2012).

Figura 11. Macro e microscopia dos fungos isolados do aquário de peixe-zebra. *Penicillium* sp. (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia); *Clonostachys* sp. (A1 frente, A2 verso, A3 morfologia).



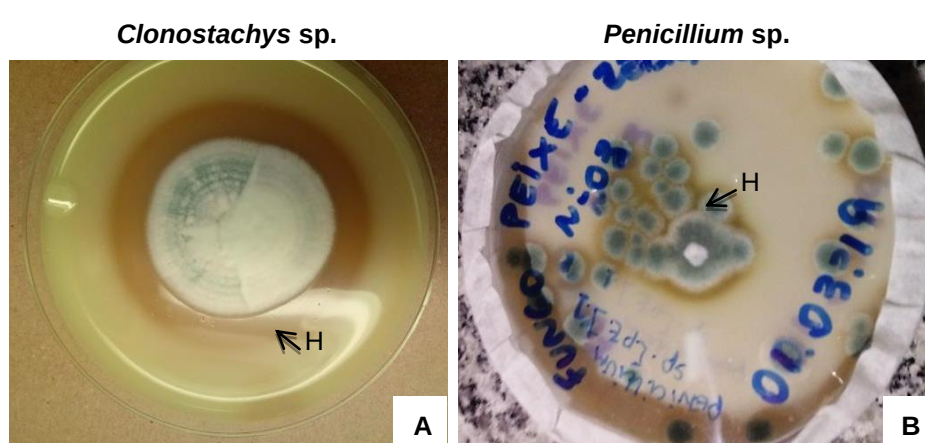
Fonte: Autora

5.1.3 Determinação do potencial de produção enzimática em estado sólido dos isolados fúngicos do aquário

O halo encontrado na colônia de *Clonostachys* sp. (Figura 12A) foi relevantemente maior do que o encontrado na colônia de *Penicillium* sp. (Figura 12B), inferindo assim uma possível produção mais acentuada do Isolado pertencente ao gênero *Clonostachys*.

Dos isolados do tanque, apenas um isolado de *Penicillium* sp. e o *Clonostachys* sp. foram selecionados para a realização da análise da capacidade produtiva de protease. O meio indutivo de produção de protease forneceu como nutriente a caseína. A caseína é uma macromolécula de natureza proteica presente no leite Molico[®]. A reação bioquímica de hidrólise da caseína, pela ação de enzimas, produzem peptonas, polipeptídios, dipeptídeos e aminoácidos livres, que são assimilados pelas células para produção de energia (GEISSELER e HORWATH, 2008). Este processo de hidrólise enzimática é possível pela presença de enzimas extracelulares produzidas pelas colônias, a qual a degradação destas proteínas existentes no meio de cultivo é comprovada pelo aparecimento de um halo na extremidade da colônia (Figura 12).

Figura 12. Produção enzimática de protease em meio sólido (Leite-Gelatina). (A) *Clonostachys* sp. (B) *Penicillium* sp. (H) Halo.



Fonte: Autora.

A existência de protease é vista em diferentes espécies de *Penicillium*, com meio indicativo de produção (BITTENCOURT, 2014; SILVA, 2018), como em processos produtivos, através de técnicas de fermentação, a exemplo de Rodrigues e Cunha (2008) ao utilizarem *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. Bem como Brito (2018) com *P. fellutanum* CFAM 60, *Penicillium* sp. CFAM 91 e *P. citrinum* CFAM 233 e Cunha (2016) que produziu utilizando resíduos agroindustriais da colheita da soja.

A espécie mais estudada do gênero *Clonostachys*, com relação à protease é *Clonostachys rosea*. A peptidase deste fungo é caracterizada como sendo uma serino-protease alcalina, amplamente elencada ao processo patogênico nos nematóides (ZHAO, et al, 2005; LI, et al., 2006; LIANG et al., 2011). Porém é inexistente estudos de produção de protease dessa espécie, visando a sua utilização em processos industriais biotecnológicos. Tal protease possui características atrativas em áreas da indústria, como a de detergentes (ZANPHORLIN, et al., 2011).

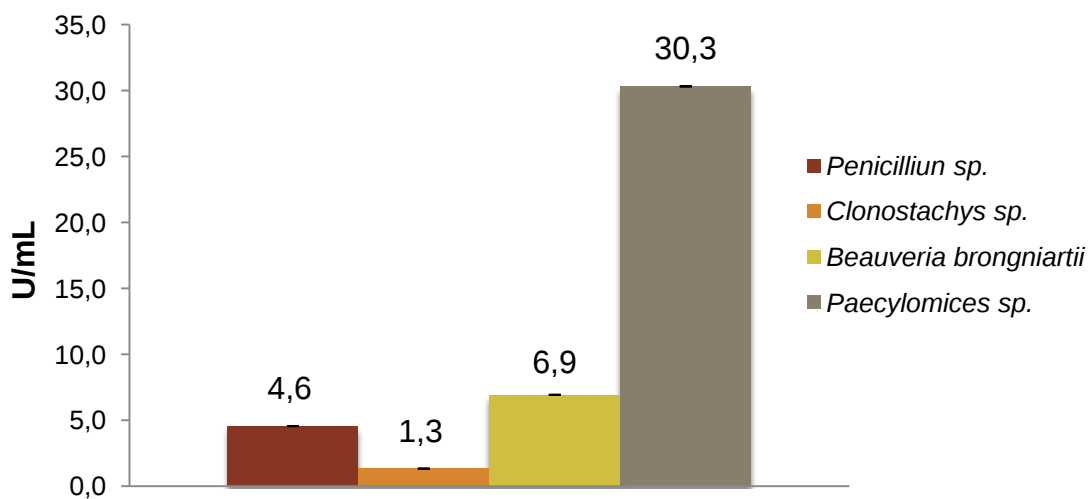
5.2 Produção enzimática por fermentação submersa

Oriunda das condições de produção promovidas pela fermentação submersa, macromoléculas proteicas, como a caseína, presente no substrato alternativo utilizado, o leite favoreceu a produção de enzimas hidrolíticas extracelulares. Tais enzimas foram importantes para o crescimento e desenvolvimento da colônia no

meio, em razão da ação catabólica em macromoléculas, gerando pequenos compostos para assimilação da célula, com vistas à formação de energia. Utilizando a metodologia de Charney e Tomarelli (1947), foi possível mensurar quantitativamente a atividade de uma das enzimas produzidas, a protease. O extrato bruto dos 4 fungos utilizados no estudo foi recuperado através da extração por filtração a vácuo, onde foi possível separar a biomassa fúngica presente na forma de *pellets*, o qual corresponde a hifas fortemente entrelaçadas e compactadas. Tal rearranjo celular foi promovido pelo meio de cultivo utilizado (HYDE, et al, 2014).

Dentre os valores obtidos de atividade enzimática pode-se destacar a protease produzida pelo isolado de *Paecylomices* sp., onde vê-se uma atividade de 30,3 U/mL, valor relativamente acentuado quando comparado aos outros isolados utilizados nessa pesquisa (*Penicillium* sp., 4,6 U/mL; *Clonostachys* sp., 1,3 U/mL; *Beauveria brongniartii* 6,9 U/mL) (Figura 13).

Figura 13. Atividade enzimática (U/mL) de *Penicillium* sp., *Clonostachys* sp.; *Beauveria brongniartii* e *Paecylomices* sp.



Fonte: Autora.

A baixa atividade encontrada não corresponde necessariamente à potencialidade de expressão enzimática desses isolados, já que na literatura é possível encontrar dados de produção peptidases de espécies *Penicillium* (HASHIMOTO et al., 1973; SINDHU, SUPRABHA e SHASHIDHAR, 2009). Como também estudos que indicam a presença de enzimas proteolíticas em *Beauveria brongniartii* (ZIMMERMANN, 2007), e *Clonostachys* (ASSEFA JIMA, 2013). No entanto os resultados da atividade enzimática nos sugerem a realização novas

pesquisas que visem à otimização dos parâmetros de produção para cada isolado, utilizando o leite como substrato. Estudos de análise experimental que busquem condições otimizadas de pH, temperatura, tempo de incubação, pressão, aeração do meio, entre outros aspectos (BORZANI et al., 2001). Outro importante parâmetro relacionado ao meio de cultivo utilizado, a razão C/N encontrada no leite, os micronutrientes e o substrato enzimático mais prevalente no meio, a caseína, podem não ter sido implicados na indução de uma expressão satisfatória dessas peptidases fúngicas. Estudos como os de Krishna et al (2009) e Sindhu, Suprabh e Shashidhar (2009), são exemplos de busca por otimização do processo de produção, pois propõem melhorias nas variáveis encontradas nos processos fermentativos, bem como na matéria-prima utilizada.

O resultado obtido pelo isolado *Clonostachys*, demonstrou uma diferença entre os resultados da determinação da produção de proteases em placa contendo meio Ágar Gelatina-Leite e a produção de protease por fermentação submersa, contendo leite desnatado como substrato. A diferença acentuada é vista pela presença de um halo expressivo no experimento da determinação do potencial enzimático, onde não foi comprovado na produção por fermentação submersa. Tal alteração pode ter relação com a presença da gelatina acrescida ao meio em placa de petri, o que pode ter favorecido a produção de uma protease do tipo collagenase, e que tal peptidase não induzida no meio de produção. Mais pesquisas podem ser realizadas para apresentar mais informações quanto aos achados desse estudo.

A pesquisa proposta neste estudo corresponde ao primeiro relato de produção de proteases utilizando isolados de *Clonostachys* sp. e o segundo utilizando *Beauveria brongniartii* (ERLACHER et al., 2006). Contudo para continuidade das análises de purificação e caracterização, escolheu-se apenas a enzima proteolítica produzida pelo isolado de *Paecilomyces* sp., em razão dos valores mais acentuados de atividade enzimática encontrados.

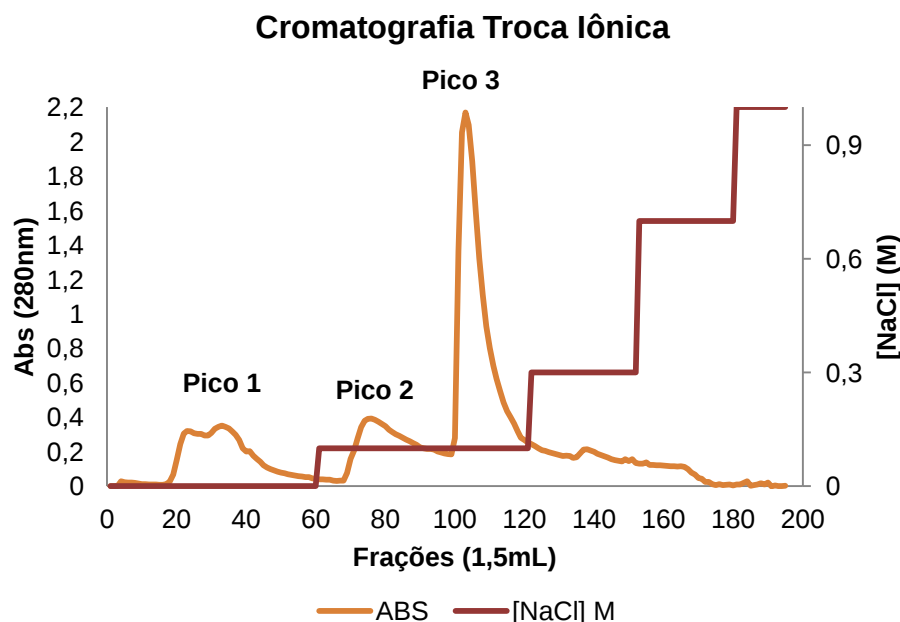
5.3 Purificação

O extrato bruto oriundo da fermentação do leite, utilizando o isolado de *Paecilomyces* sp. foi purificado, primeiramente por solvente orgânico (etanol 95%). A fração 30-80% apresentou maior atividade enzimática total (5,688 U), maior concentração proteica (37036,0 µg) e atividade enzimática específica mais próxima aos valores vistos no extrato bruto (0,154 U/µg). Esta fração foi considerada a que

apresentou maior quantidade de enzima, apesar de incremento de purificação negligenciável (Tabela 3). Logo após essa etapa, a amostra foi submetida a cromatografia por troca iônica. Foram coletadas 194 frações de 1mL, que correspondeu ao período de adição da solução tampão (Tris-HCl 0,1M pH 8,0), para a estabilização da coluna, até a adição da solução de maior concentração salina (Tris-HCl 0,1M pH 8,0 + NaCl 1M).

Três picos de maior concentração proteica foram obtidos, quando analisado no comprimento de onda de 280 nm (Figura 15). Ao analisar a atividade enzimática dos eluentes representativos de cada ponto, foi possível observar que o pico 1 (Figura 15) corresponde a região que contém a enzima proteolítica, logo, pode-se inferir que a amostra enzimática não teve grande interação com a fase estacionária, diferente dos outros dois picos proteicos, posteriormente eluídos. Tal informação pode inferir que a ausência de atração da enzima, pela fase estacionária, ao observar a natureza catiônica da resina, pode-se dá pela semelhança entre as cargas do produto de interesse (protease) e a resina (Figura 15).

Figura 12. Perfil de eluição da fração 30-80% de proteases de *Paecilomyces* sp.



Ao final do processo de purificação obteve-se uma protease 16,08 vezes purificada com um rendimento de 35%. Observando melhor cada etapa do processo, é possível constatar que o processo de purificação, utilizando o etanol, não

demonstrou aumento na pureza da amostra, pois ao analisar o valor de purificação da fração selecionada, vê-se apenas um aumento de 0,02 na taxa de pureza e uma perda 43% do rendimento, em relação ao extrato centrifugado. Já comparado ao pico 01 da cromatografia, a amostra tornou-se mais pura (16,08 vezes) e a perda de rendimento, em relação à fração 30-80% foi apenas de 22%. A diminuição do rendimento é esperada, pois há uma perda substancial da amostra ao longo dos processos de purificação (VOGEL, 1971) (Tabela 3).

Tabela 3. Dados de purificação da protease de *Paecilomyces* sp. produzida por fermentação submersa em meio leite desnatado.

Fração	Proteína (µg)	Atividade (U)	Atividade Específica (U/µg)	Rendimento (%)	Purificação (fold)
Extrato centrifugado	66223,5	9,9	0,1	100%	1,00
0-30%	589,2	0,4	0,6	4%	4,07
30-80%	37036,0	5,7	0,1	57%	1,02
SF	12053,5	2,3	0,2	23%	1,29
Pico 01	1445,2	3,5	2,4	35%	16,08
Pico 02	660,8	0,7	1,1	7%	7,08
Pico 03	1210,8	1,1	0,9	11%	6,26

Fonte: Autora

Diante desses resultados, é possível afirmar que a etapa de purificação por solventes orgânicos poderia ser dispensável para as condições e amostras descritas, e que apenas a cromatografia por troca iônica seria capaz de fornecer um produto purificado e de rendimento aceitável. Tal modificação favoreceria um aumento final do rendimento e decaimento dos custos de obtenção do produto, em razão da diminuição de uma etapa de purificação da enzima.

5.4 Caracterização das proteases

5.4.1 Inibidores de serino-protease

Os inibidores específicos de serino-proteases foram utilizados para caracterizar a classe enzimática da protease (Tabela 4). O que demonstrou que as peptidases do fungo *Paecilomyces* sp. não são inibidas por nenhum dos inibidores específicos de serino-protease analisados. Ao invés disso, houve um leve aumento

da atividade enzimática, quando comparado ao controle. Com intuito de confirmar atividade dos inibidores utilizados, realizamos o mesmo ensaio utilizando a tripsina bovina, pois é um modelo experimental para caracterização das serino-proteases (VIVAS, 2007). Para a tripsina bovina foi obtida a inibição caracterizada pela diminuição da atividade por todos os inibidores utilizados, com valor mais prevalente de inibição por TLCK (7%). O que é esperado, já que o tosil-L-lisil-clorometano (TLCK) é um inibidor irreversível de tripsinas. Era esperada também uma inibição mais alta por PMSF, sendo este um inibidor irreversível de serino-protease. Contudo, pelos diversos ensaios realizados no laboratório ter constatado uma diminuição da ação dessa solução utilizada, justificando o valor de atividade enzimática encontrada, quando posto em contato com a tripsina bovina.

Infelizmente não obtivemos acesso aos inibidores de outras classes, para determinar com mais exatidão qual classe enzimática pertence a protease produzida por *Paecilomyces* sp. em meio leite desnatado.

Tabela 4. Análise da atividade enzimática do ensaio de inibição com inibidores de serino-protease.

Enzima	Atividade enzimática (%)				
	Controle negativo	Inibidores			
		TPCK	TLCK	Benzamidina	PMSF
Protease <i>Paecilomyces</i> sp.	100	111	133	153	132
Tripsina Bovina	100	81	7	41	98

Fonte: Autora

Estes achados diferem dos encontrados por Cavello, Cavalitto e Hours (2012), que produziram serino-proteases alcalinas de *Paecilomyces lilacinus* por fermentação submersa, utilizando penas de galinha como substrato. A classe enzimática da protease produzida foi confirmada pela inibição após a incubação com PMSF, com atividade residual de 12%. Vê-se resultados semelhantes, utilizando essa mesma espécie (KOTLOVA et al., 2007) e outra espécie do mesmo gênero (*Paecilomyces fumosoroseus*) (CASTELLANOS-MOGUEL et al., 2007), o qual relataram a presença de uma serino-proteinase do tipo subtilisina dependente de tiol.

As proteases alcalinas, tais como a serino-protease são as mais produzidas, elucidadas e aplicadas industrialmente, por ser mais abundantes nos microrganismos, isso é comprovado pelos diversos trabalhos disponíveis que demonstram a produção destas enzimas por fungos filamentosos (AGUILAR, DE CASTRO e SATO, 2019). Mas há um estudo que demonstra forte inibição por pepstatina, em enzimas ácidas oriundas de diversos fungos, incluindo a espécie *Paecilomyces varioti* (TAKAHASHI e CHANG, 1976). A pepstatina é um inibidor altamente seletivo de proteases ácidas, aspartil peptidase (NASCIMENTO, 2008). Tal achado sugere mais estudos para a confirmação quanto à classe de protease produzida, já que não sendo uma serino-protease, as aplicações podem ser altamente diversificadas, sendo voltadas principalmente para a indústria farmacêutica (SHAMSI, PARVEEN e FATIMA, 2016). Como também, esse estudo pode caracterizar uma nova classe de protease de *Paecilomyces*, o que necessita de um estudo mais aprofundado para comprovar essa hipótese.

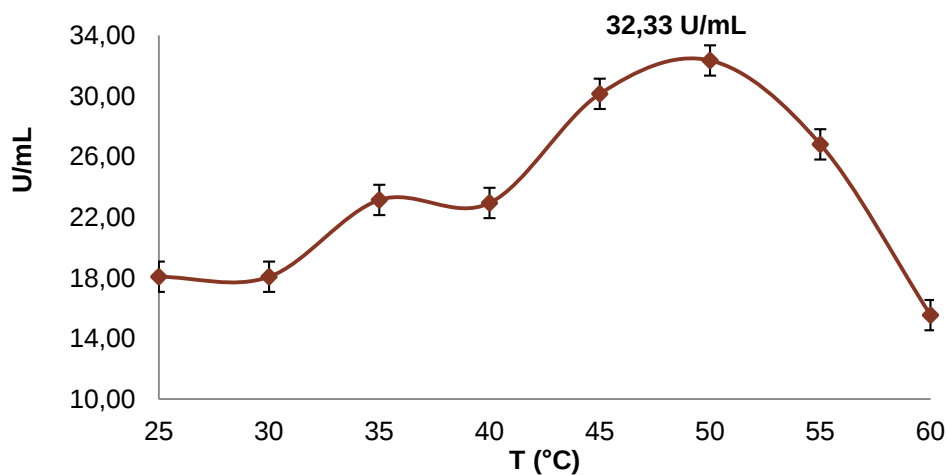
5.4.2 Análise da temperatura ótima e termoestabilidade

A protease encontrada no extrato bruto enzimático do fungo *Paecilomyces* sp. apresentou maior atividade na faixa de temperatura de 50 °C (32,33 U/mL) (Figura 16). Observa-se que, quanto maior a temperatura, maior a atividade enzimática, até 50 °C. Após essa faixa, o calor favorece a desnaturação proteica pela desestabilização das interações e ligações entre as moléculas. No entanto, quando comparamos o efeito da temperatura sobre a enzima purificada, vê-se uma diminuição da temperatura ótima (35 °C), com atividade proteolítica de 12,5 U/mL (Figura 17). Este efeito é possível devido à presença de proteínas que estabilizem as enzimas, fazendo com que mantenham a sua atividade, mesmo sobre a influência do aumento da temperatura.

As proteases encontradas nesse estudo, no extrato bruto da fermentação submersa pelo *Paecilomyces* sp., podem ser caracterizadas como enzimas termoestáveis, por demonstrar atividade entre 40 e 50°C (GOMES et al., 2007). Tais enzimas apresentam vantagens para aplicação na indústria, pois em processos biotecnológicos, o aumento da temperatura é necessário para diminuir a contaminação por organismos mesófilos, que são prevalentes no ambiente, como

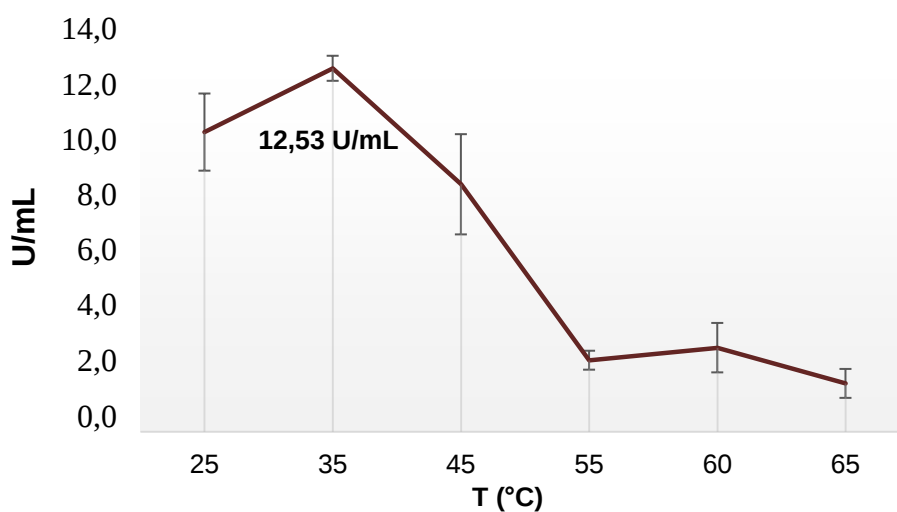
também favorecem a maior solubilidade dos substratos e produtos (DE PALMA-FERNANDEZ, GOMES e DA SILVA, 2002).

Figura 13. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da protease do extrato bruto de *Paecilomyces* sp.



Fonte: Autora

Figura 14. Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da protease purificada de *Paecilomyces* sp.



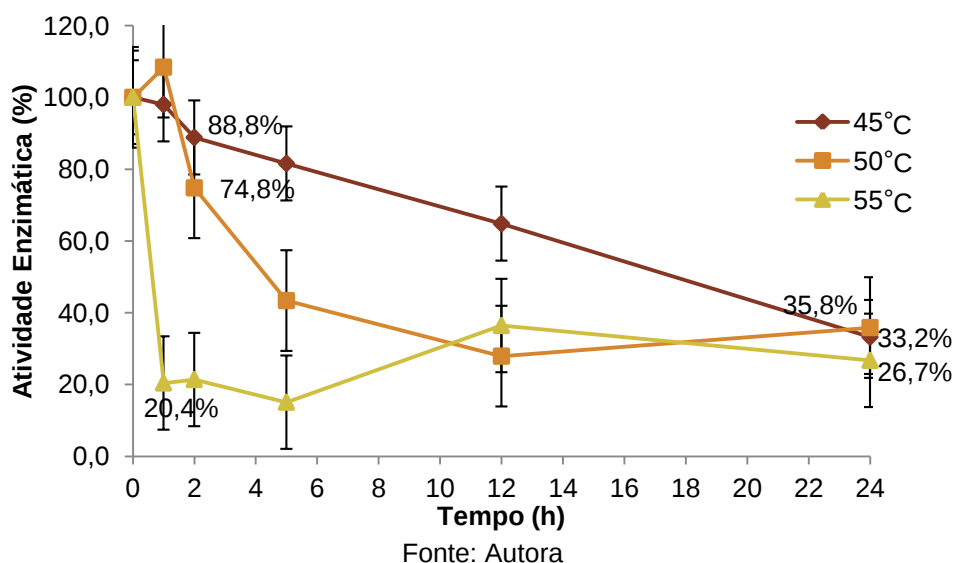
Fonte: Autora

A temperatura ideal de trabalho são aquelas em que a protease apresenta maior atividade e que a atividade é mantida nestas condições. Estudos de temperatura ótima de uma enzima são essenciais para a caracterização bioquímica, pois inferem informações quanto a velocidade e de uma reação, já que baixas temperaturas desfavorecem a ligação do substrato com o seu sítio ativo, e também

altas temperaturas provocam desnaturação das enzimas (DANIEL e DANSON, 2013).

A análise da termoestabilidade enzimática foi realizada com intuito de determinar por quanto tempo a protease de *Paecilomyces* sp., manteria a atividade proteolítica. Deste modo, o extrato bruto foi incubado, nas temperaturas 45, 50 e 55°C, no intervalo de tempo de 24h. Após uma hora de incubação da amostra em 55°C, houve uma queda acentuada para valores de 20,4% da atividade enzimática, mantendo-se até a última hora de análise (24h) (Figura 18). Já nas temperaturas 45 e 50°C, a redução da atividade foi vista apenas a partir da segunda hora (88,8% e 74,8%, respectivamente), decaindo continuamente ao longo do tempo chegando no final aos valores de 35,8% e 33,2%, nas temperaturas de 45 e 50°C, respectivamente.

Figura 15. Determinação da estabilidade térmica da protease do extrato bruto de *Paecilomyces* sp.

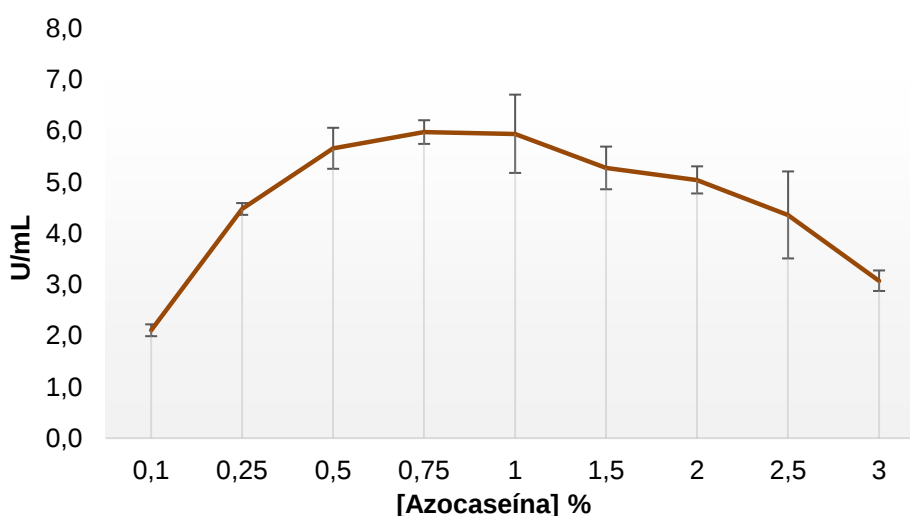


5.4.3 Cinética enzimática

A cinética de atividade proteolítica com variação da concentração do substrato revelou que a amostra purificada da protease de *Paecilomyces* sp. tem a atividade crescente sobre a azocaseína até a concentração de 0,5% (5 U/mL), a partir desse ponto é possível observar um perfil de saturação (Figura 19). A partir da concentração de 1% do substrato é possível observar um decréscimo da atividade que não difere estatisticamente da região de saturação. Concentração essa que é a

estabelecida pelo método de análise da atividade empregado nesse estudo (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). No entanto, a partir da concentração de 2,5% vê-se a diminuição significativa na atividade enzimática, que continua na concentração posterior. Esse comportamento cinético difere da cinética enzimática clássica de Michaelis–Menten (PINTO e DE MENEZES, 2009). Explica-se tal comportamento em razão de que, em alguns casos, o substrato ou o produto das reações enzimáticas, quando encontrados em concentrações suficientemente elevadas, podem agir como um inibidor. Esta ação inibitória pode ser reversível e irreversível (ANDRIĆ et al., 2010a). A inibição por substrato corresponde à interação entre o complexo enzima-substrato (ES) e o substrato (MARANGONI, 2003), ou seja, duas moléculas de substrato ligam-se ao sítio ativo da enzima formando um complexo (ESS) não produtivo (ANDRIĆ et al., 2010b). A alta concentração do substrato inibe a sua própria conversão pela reação enzimática (VÁSQUEZ, 2017).

Figura 16. Perfil cinético com variação do substrato para a enzima purificada de *Paecilomyces* sp. As amostras foram ensaiadas (30µl) sobre a solução de azocaseína em diferentes concentrações, incubação de 1 hora a TA.



Fonte: Autora

Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} da enzima protease purificada foram obtidos experimentalmente, os quais foram de 0,142% e 5,8 U/mL, respectivamente. O valor de K_m demonstra uma alta afinidade da enzima produzida pelo substrato utilizado nesse estudo, pois corresponde a um valor próximo a menor concentração do substrato, o que implica uma alta tendência de ligação da enzima com o substrato, comprovado pelo rápido alcance do valor médio do V_{max} . Conforme visto

na literatura, quanto menor o valor de K_m maior a afinidade do catalizador pelo substrato (CHA et al., 1994), logo, a observação desse parâmetro fornece informações quanto a eficiência catalítica da protease produzida, como também pode demonstrar uma melhor adaptação do substrato ao centro ativo da enzima (Oliveira et al., 1993).

A estimativa da atividade de uma enzima em uma amostra biológica é essencial para o completo entendimento do mecanismo de ação da enzima, esta atividade pode ser influenciada por vários fatores, incluindo concentração de substrato e enzima, pH, temperatura e a presença de ativadores ou inibidores (WILSON e WALKER, 2010).

Neste estudo pode-se observar achados que contribuem para o conhecimento acerca das proteases de fungos filamentosos, demonstrando um novo produto e processo biotecnológicos, pois foi possível analisar quatro isolados fúngicos de diferentes origens, quanto a capacidade de produção de peptidases, e realizar ensaios de purificação e caracterização da protease do fungo que mostrou melhor desempenho e também propor um meio de cultivo alternativo, o leite desnatado, visando eficiência e baixo custo.

6 CONCLUSÕES

Diante dos dados obtidos conclui-se:

- Os isolados fúngicos de *Beauveria brongniartii*, *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. e *Clonostachys* sp. mostraram-se produtores de proteases. Sendo este o primeiro relato de produção por *Beauveria brongniartii* e o segundo utilizando *Clonostachys* sp.
- O processo de produção por fermentação submersa utilizando o leite desnatado foi eficiente para obtenção de proteases fúngicas.
- A protease purificada de *Paecilomyces* sp. mostrou rendimento de 35% e uma taxa de purificação de 16,08 vezes.
- A protease de *Paecilomyces* sp. é termoestável, pois apresenta atividade ótima em 50 °C, no extrato bruto e na enzima purificada em 35 °C. Sua termoestabilidade é vista nas primeiras duas horas em temperaturas de 50 °C para o extrato bruto.
- Quanto a cinética enzimática, demonstrou um padrão cinético diferente do clássico, e parâmetros cinéticos com valores de $K_m = 0,142\%$ e $V_{m\acute{a}x} = 6,8 \text{ U/mL}$.

7 REFERÊNCIAS

- AGUILAR, Jessika G. dos S.; DE CASTRO, Ruann JS; SATO, Hélia H. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* LBA 46 in a bench reactor: effect of temperature and agitation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 615-625, 2019.
- ALEXOPOULOS, Constantine John et al. **Introductory mycology**. John Wiley and Sons, 1996.
- ALI, Sajid. Anti-Cancerous Metabolites and Extracellular Enzyme Production by Endophytic *Penicillium* and *Paecilomyces* Strains. 2017. Tese de Doutorado. University of Peshawar, Peshawar.
- ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lípases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.
- ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos em controle microbiano de insetos. 2nd Fundação Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Brazil, p. 289-381, 1998.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., & DAM-JOHANSEN, K. (2010a). Effect and modeling of glucose inhibition and in situ glucose removal during enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Applied biochemistry and biotechnology**, 160 (1), 280.
- ANDRIĆ, P., MEYER, A. S., JENSEN, P. A., & DAM-JOHANSEN, K. (2010b). Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis: I. Significance and mechanism of cellobiose and glucose inhibition on cellulolytic enzymes. **Biotechnology advances**, 28 (3), 308-324.
- ASSEFA JIMA, Thomas. Postharvest Biological control of *Fusarium* dry-rot diseases in potato tubers using *Clonostachys rosea* strain IK726. 2013.
- ATLAS, Ronald M. Handbook of microbiological media. CRC press, 2010.
- BAINIER, G. Mycothèque de l'école de Pharmacie XL *Paecilomyces*, genre nouveau de Mucédinées. Bulletin trimestriel de la Société mycologique de France, 23: 26-27. 1907.
- BAKERI, Shamsilawani Ahamed et al. Efficacy of entomopathogenic fungi, *Paecilomyces* spp., in controlling the oil palm bagworm, *Pteroma pendula* (Joannis). J. Oil Palm Res, v. 21, p. 693-699, 2009.

BEZERRA, Nathalia Souza et al. Eficiência de fungos entomopatogênicos sobre formigas cortadeiras (Hymenoptera: Formicidae). 2018. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

BITTENCOURT, Mona Lisa Sousa de Assis. Avaliação do perfil de proteases expressas por *Penicillium fellutanum* e *Penicillium restrictum* isolados do solo do cerrado brasileiro. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade de Brasília, Brasília.

BORBA, C.M.; BRITO, M.M.S. *Paecilomyces*: Mycotoxin production and human infection. In Molecular Biology of Food and Waterborne Mycotoxigenic and Mycotic Fungi; Paterson, R.R.M., Lima, N., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 401–421. ISBN 978.

BOREL, F. C. Metabólitos de *Clonostachys rosea* inibidores a *Botrytis cinerea*, sobrevivência do antagonista e efeito sobre o microbioma foliar de tomateiro. 2018. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BORGES, Álefe V.; SARAIVA, Rodrigo M.; MAFFIA, Luiz A. Biocontrol of gray mold in tomato plants by *Clonostachys rosea*. *Tropical Plant Pathology*, v. 40, n. 2, p. 71-76, 2015.

BORZANI, Walter et al. Biotecnologia industrial: fundamentos. **São Paulo: Edgard Blücher**, v. 1, p. 254, 2001.

BRAGA, Fabio Ribeiro et al. Efeito do fungo *Paecilomyces lilacinus* sobre ovos de *Taenia saginata*. *Rev soc bras med trop*, v. 41, n. 6, p. 686-8, 2008.

BRASIL, Rafaella Belchior et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. 2015.

BRITO, A. K. P. Caracterização parcial de proteases produzidas por espécies de *Penicillium*. 2018. 32 f. TCC (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

BROWN, Agnes HS; SMITH, George. The genus *Paecilomyces bainier* and its perfect stage *Byssochlamys Westling*. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 40, n. 1, p. 17-IN3, 1957.

BUCKINGHAM, Susan J.; HANSELL, David M. Aspergillus in the lung: diverse and coincident forms. **European radiology**, v. 13, n. 8, p. 1786-1800, 200

CAREY, Jeanne et al. *Paecilomyces lilacinus* vaginitis in an immunocompetent patient. **Emerging infectious diseases**, v. 9, n. 9, p. 1155, 2003.

CASTELLANOS-MOGUEL, Judith et al. Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *Paecilomyces*

fumosoroseus isolates from whiteflies (Homoptera: *Aleyrodidae*). **Revista iberoamericana de micología**, v. 24, n. 1, p. 62, 2007.

CAVELLO, Ivana Alejandra; CAVALITTO, Sebastian Fernando; HOURS, Roque Alberto. Biodegradation of a keratin waste and the concomitant production of detergent stable serine proteases from *Paecilomyces lilacinus*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 945-958, 2012.

CHA, Jaeho et al. Perturbing the metal site in D-xylose isomerase. Effect of mutations of His-220 on enzyme stability. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 4, p. 2687-2694, 1994.

CHARNEY, Jesse; TOMARELLI, Rudolph M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J. biol. Chem*, v. 171, n. 2, p. 501-505, 1947.

CHATTERTON, Syama; PUNJA, Zamir K. Chitinase and β -1, 3-glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* *F. catenulata* against fungal plant pathogens. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 356-367, 2009.

CHELLAPANDI, P. Production and preliminary characterization of alkaline protease from *Aspergillus flavus* and *Aspergillus terreus*. **E-Journal of Chemistry**, v. 7, 2010.

CONTESINI, F. J. Production, characterization and application of proteases from *Bacillus* sp. São Paulo, Brazil: School of Food Engineering, University of Campinas. 2014. Tese de Doutorado. Phd thesis.

COUTO, Susana Rodriguez; SANROMÁN, Ma Angeles. Application of solid-state fermentation to food industry—a review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 291-302, 2006.

CRUEGER, W & CRUEGER, A. *Biotechnologia – Manual de Microbiologia Industrial*. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha, 1993.

CUNHA, Joice Raísa Barbosa et al. Cultivo de *Penicillium* spp. em resíduos da colheita de soja para produção de celulase, protease e amilase. **Revista Ceres**, v. 63, n. 5, p. 597-604, 2016.

CZECZOT, A. M. Desenvolvimento de sistemas de análise da função gênica para fungos entomopatogênicos: Construção de linhagem Δ Ku70 em *Metarhizium anisopliae*. [Monografia]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2016.

D'HALEWYN, Marie-Alix; CHEVALIER, Pierre. **Penicillium spp.** Institut national de santé publique Québec, Québec, 28 jul 2016. Disponível em: <<https://www.inspq.qc.ca/en/moulds/fact-sheets/penicillium-spp>>. Acesso em: 21 de agosto de 2020.

DA SILVA, Janaina Lima et al. Protein concentrate obtainment from leaves and aerial part cassava (*Manihote sculenta Crantz*). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2279-2288, 2012.

DALGLEISH, Douglas G. On the structural models of bovine casein micelles—review and possible improvements. **Soft matter**, v. 7, n. 6, p. 2265-2272, 2011.

DANIEL, Roy M.; DANSON, Michael J. Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. **FEBS letters**, v. 587, n. 17, p. 2738-2743, 2013.

DE ALMEIDA LIMA, Urgel (Ed.). **Biotecnologia industrial: Processos, fermentativos, e enzimáticos**. Blucher, 2001.

DE ALMEIDA OLIVEIRA, M. G. et al. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin: identification by covalent labeling with p-diazoniumbenzamidine and kinetic characterization of Tyr-151-(p-benzamidino)-azo- β -trypsin. **The Journal of biological chemistry (Print)**, v. 268, n. 36, p. 26893-26903, 1993.

DE PALMA-FERNANDEZ, E. R.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Purification and characterization of two β -glucosidases from the thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Folia microbiologica**, v. 47, n. 6, p. 685-690, 2002.

DELGADO-RAMOS, Lidia et al. Flow cytometry of microencapsulated colonies for genetics analysis of filamentous fungi. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 4, n. 11, p. 2271-2278, 2014.

DONG, J. Y. et al. Nematicidal effect of freshwater fungal cultures against the pine-wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*. **Fungal Divers**, v. 15, p. 125-135, 2004.

DOS SANTOS AGUILAR, Jessika Gonçalves; SATO, Hélia Harumi. Microbial proteases: production and application in obtaining protein hydrolysates. **Food Research International**, v. 103, p. 253-262, 2018.

DRIOUCH, Habib; SOMMER, Becky; WITTMANN, Christoph. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. **Biotechnology and bioengineering**, v. 105, n. 6, p. 1058-1068, 2010.

ERLACHER, Angelika et al. A new cuticle scale hydrolysing protease from *Beauveria brongniartii*. **Biotechnology letters**, v. 28, n. 10, p. 703, 2006.

FAN, Jinhua et al. The effect of *Beauveria brongniartii* and its secondary me-tabolites on the detoxification enzymes of the pine caterpillar, *Dendrolimus tabulaeformis*. **Journal of Insect Science**, v. 13, n. 1, p. 44, 2013.

FERNANDES, A. P. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos isolados de diferentes fontes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FITZGERALD, R. J.; MEISEL, H. Milk protein hydrolysates and bioactive peptides. In: **Advanced dairy chemistry—1 Proteins**. Springer, Boston, MA, 2003. p. 675-698.

FOX, P. F.; BRODKORB, A. The casein micelle: Historical aspects, current concepts and significance. **International Dairy Journal**, v. 18, n. 7, p. 677-684, 2008.

FRISVAD, Jens C.; ANDERSEN, Birgitte; THRANE, Ulf. The use of secondary metabolite profiling in chemotaxonomy of filamentous fungi. **Mycological research**, v. 112, n. 2, p. 231-240, 2008.

GARCÍA-REYES, M. et al. Formation, morphology and biotechnological applications of filamentous fungal pellets: a review. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 16, n. 3, p. 703-720, 2017.

GASMALLA, Mohammed AA et al. Evaluation of some physicochemical parameters of three commercial milk products. 2013.

GEISSELER, D.; HORWATH, W. R. Regulation of extracellular protease activity in soil in response to different sources and concentrations of nitrogen and carbon. **Soil. Biol. Biochem**, v. 40, p. 3040-3048, 2008.

GERNGROSS, Tillman U. Advances in the production of human therapeutic proteins in yeasts and filamentous fungi. **Nature biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1409, 2004.

GHIMIRE, Prakriti Sharma; JIN, Cheng. Genetics, molecular, and proteomics advances in filamentous fungi. **Current microbiology**, v. 74, n. 10, p. 1226-1236, 2017.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 96p. 2006.

GIRAUD, Frédéric et al. Microsatellite loci to recognize species for the cheese starter and contaminating strains associated with cheese manufacturing. **International journal of food microbiology**, v. 137, n. 2-3, p. 204-213, 2010.

GOMES, Eleni et al. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Química nova*, p. 136-145, 2007.

GOMES, Helder Andrey Rocha et al. Identification of multienzymatic complexes in the *Clonostachys byssicola* secretomes produced in response to different lignocellulosic carbon sources. **Journal of biotechnology**, v. 254, p. 51-58, 2017.

GRASSMANN, Wolfgang; DYCKERHOFF, Hanns. Über die Proteinase und die Polypeptidase der Hefe. 13. Abhandlung über Pflanzenproteasen in der von R.

Willstätter und Mitarbeitern begonnenen Untersuchungsreihe. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie**, v. 179, n. 1-3, p. 41-78, 1928.

GUEDES, T. P.; BONIFÁCIO, T. T. C.; DOURADO, R.; CAVALCANTI, T. G.; DIAS, D. S. B.; SOUSA, A. C. B.; VASCONCELOS, U. Identification of Ascomycetes Recovered From Petrol Stations in the Metropolitan Region of João Pessoa-PB, Brazil. *Journal of Engineering Research and Application*, v. 8, n. 4, p.50-55, 2018.

GUIJARRO, B. et al. *Penicillium frequentans* population dynamics on peach fruits after its applications against brown rot in orchards. **Journal of applied microbiology**, v. 104, n. 3, p. 659-671, 2008.

HASHIMOTO, Hikotaka et al. Production and purification of acid protease from the thermophilic fungus, *Penicillium duponti* K1014. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 584-588, 1973.

HERRERA BRAVO DE LAGUNA, I.; TOLEDO MARANTE, F. J.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of applied microbiology**, v. 119, n. 6, p. 1455-1466, 2015.

HOLT, Carl. An equilibrium thermodynamic model of the sequestration of calcium phosphate by casein micelles and its application to the calculation of the partition of salts in milk. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 5, p. 421-434, 2004.

HOOG, GS de et al. The genera *Beauveria*, *Isaria*, *Tritirachium* and *Acrodontium* gen. nov. *Stud. Mycol*, v. 1, p. 1-41, 1972.

HU, Honggang et al. Synthesis and in vitro inhibitory activity of matrine derivatives towards pro-inflammatory cytokines. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 20, n. 24, p. 7537-7539, 2010.

HUGHES, S.J. *Studies on micro-fungi. XI. Some Hyphomycetes, which produce phialides*. **Mycol. Pap.** 1951, 45, 1–36.

HYDE, Kevin D. et al. One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I (2014). **Fungal Diversity**, v. 67, n. 1, p. 21-125, 2014.

IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, Hamid. Biosynthesis of acid proteases by *Penicillium griseoroseum* IH-02 in solid-state fermentation. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 7, p. 2717-2724, 2007.

INGLIS, Peter W.; TIGANO, Myrian S. Identification and taxonomy of some entomopathogenic *Paecilomyces* spp.(Ascomycota) isolates using rDNA-ITS sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 1, p. 132-136, 2006.

IUBMB. ExplorEnz – The Enzyme Database. Disponível em <https://www.enzyme-database.org/cinfo.php?c=3&sc=4&ssc=>> Acesso em 02 nov. 2019.

JOO, Han-Seung; CHANG, Chung-Soon. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3-4, p. 1263-1270, 2005.

KIMATI, Hiroshi et al. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. São Paulo: **Agronômica Ceres**, 2 ed. São Paulo, 1997.

KITTS, David D.; WEILER, Katie. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 16, p. 1309-1323, 2003.

KONG, Xiangzhen; ZHOU, Huiming; QIAN, Haifeng. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 759-763, 2007.

KOTLOVA, E. K. et al. Thiol-dependent serine proteinase from *Paecilomyces lilacinus*: Purification and catalytic properties. **Biochemistry (Moscow)**, v. 72, n. 1, p. 117-123, 2007.

KRISHNA, Vamsi K. et al. Optimization of growth and production of protease by *Penicillium* species using submerged fermentation. **International Journal of Microbiology Research**, v. 1, n. 1, p. 14, 2009.

KUMAR, Sushil et al. Extracellular acid protease from *Rhizopus oryzae*: purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 5, p. 1701-1705, 2005.

LEFORT, François et al. Pathogenicity of Entomopathogenic Fungi to the Green Peach aphid *Myzus persicae* Sulzer (Aphididae) and the European Tarnished Bug *Lygus rugulipennis* Poppius (Miridae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control**, v. 24, n. 2, p. 379, 2014.

LEHNINGER, A. L., COX, M. M., & NELSON, D. L. (1985). Princípios de Bioquímica. In: A. L. LEHNINGER, M. M. COX, & D. L. NELSON, Princípios de Bioquímica (p. 725 p). São Paulo: Sarvier.

LI, Jun et al. Purification and characterization of an extracellular serine protease from *Clonostachys rosea* and its potential as a pathogenic factor. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 925-929, 2006.

LI, Moxiao et al. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. **FEMS microbiology letters**, v. 243, n. 2, p. 323-329, 2005.

LI, Qing et al. Commercial proteases: present and future. *FEBS letters*, v. 587, n. 8, p. 1155-1163, 2013.

LIANG, Lianming et al. Cloning and homology modeling of a serine protease gene (PrC) from the nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. **Annals of microbiology**, v. 61, n. 3, p. 511-516, 2011.

LIANG, Z. Q. et al. Studies on the genus *Paecilomyces* in China V. Taifanglania gen. nov. for some monophialidic species. **Fungal Diversity**, v. 34, p. 69, 2009.

LIVNEY, Yoav D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current opinion in colloid & interface science**, v. 15, n. 1-2, p. 73-83, 2010.

LOPES, Andreza et al. Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 14, n. 4, 2017.

MACHELEIDT, Juliane et al. Regulation and role of fungal secondary metabolites. **Annual review of genetics**, v. 50, p. 371-392, 2016.

MANDALARI, G. et al. Production of feruloyl esterases and xylanases by **Talaromyces stipitatus** and *Humicola grisea* var. *thermoidea* on industrial food processing by-products. **Bioresource technology**, v. 99, n. 11, p. 5130-5133, 2008.

MARANGONI, Alejandro G. **Enzyme kinetics: a modern approach**. John Wiley & Sons, 2003.

MARKETS AND MARKETS. (2020). Acesso em 21 de agosto de 2020, disponível em Market and Markets: <<https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/industrial-enzymes-market-237327836.html>>

MCMAHON, Donald J.; OOMMEN, Bonney S. Casein micelle structure, functions, and interactions. In: **Advanced dairy chemistry**. Springer, Boston, MA, 2013. p. 185-209.

MICHELIN, Michele et al. Purification and characterization of a thermostable α -amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. **Carbohydrate research**, v. 345, n. 16, p. 2348-2353, 2010.

MOHANTY, D. P. et al. Milk derived bioactive peptides and their impact on human health—A review. **Saudi journal of biological sciences**, v. 23, n. 5, p. 577-583, 2016.

MOREIRA, Danielly C.; OLIVEIRA, Manoel ME; BORBA, Cintia M. Human Pathogenic *Paecilomyces* from Food. **Microorganisms**, v. 6, n. 3, p. 64, 2018.

MOREIRA, G. M. Caracterização de espécies de *Clonostachys* e avaliação do parasitismo a *Botrytis cinerea*. 2012. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORRIS, E.F. The Synnematosus Genera of the Fungi Imperfecti; Western Illinois University: Macomb, IL, USA, 1963; p. 137.

MOURA, C. M. R. Produção de Tanase por Amostras de *Penicillium* ssp. Isoladas do Semi-Árido do Estado de Pernambuco, Utilizando Meios Contendo Resíduos

Agroindustriais. 2015. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Recife.

NASCIMENTO, Alessandro S. et al. Statistical coupling analysis of aspartic proteinases based on crystal structures of the *Trichoderma reesei* enzyme and its complex with pepstatin A. **Journal of molecular biology**, v. 382, n. 3, p. 763-778, 2008.

NASCIMENTO, Wellingta Cristina Almeida do; MARTINS, Meire Lelis Leal. Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2006.

NEURATH, Hans. The versatility of proteolytic enzymes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 35-49, 1986.

NICOLETTI, Rosario et al. Bioprospecting for antagonistic *Penicillium* strains as a resource of new antitumor compounds. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 189-195, 2008.

NINGTHOUJAM, Debananda S. et al. Screening, identification of best producers and optimization of extracellular proteases from moderately halophilic alkalithermotolerant indigenous actinomycetes. **World Appl Sci J**, v. 7, n. 7, p. 907-916, 2009.

OKUDA, Toru et al. Production of TMC-151, TMC-154 and TMC-171, a new class of antibiotics, is specific to 'Gliocladium roseum' group. **Mycoscience**, v. 41, n. 3, p. 239-253, 2000.

OLIVEIRA, G. F. S. *Ação de Paecilomyces lilacinus e Paecilomyces farinosus sobre teleóginas de Boophilus microplus*. 2003. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ONIONS, A.H.S.; BARRON, G.L. Monophialidic species of *Paecilomyces*. **Mycol. Pap.** 1967, 107, 1–5.

PALLU, A. P. S. Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar. 2010. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PANDEY, Ashok; SOCCOL, Carlos R.; MITCHELL, David. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process biochemistry**, v. 35, n. 10, p. 1153-1169, 2000.

PANT, Gaurav et al. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 9, n. 1, p. 50-55, 2015.

PEREIRA, Ana Leonor; PITA, João Rui. Alexander Fleming (1881-1955): da descoberta da penicilina (1982) ao prémio Nobel (1945). *História: revista da Faculdade de Letras da Universidade do Porto*, v. 6, 2018.

PÉREZ-CARRILLO, Esther et al. Effect of sorghum decortication and use of protease before liquefaction with thermoresistant α -amylase on efficiency of bioethanol production. **Cereal chemistry**, v. 85, n. 6, p. 792-798, 2008.

PIEPENBRING, Meike et al. Leaf shedding and weather in tropical dry-seasonal forest shape the phenology of fungi—Lessons from two years of monthly surveys in southwestern Panama. **Fungal ecology**, v. 18, p. 83-92, 2015.

PINTO, Gerson Ferreira; DE MENEZES, Reginaldo Ramos. Cinética enzimática. Editora E-papers, 2009.

PINTO, Marta Heidtmann. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. 2008. 147f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2008.

PREECHASUTH, Kanya et al. Cell wall protection by the *Candida albicans* class I chitin synthases. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, p. 264-276, 2015.

RAO, Mala B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

REGULY, Júlio Carlos. Biotecnologia dos processos fermentativos: fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. **Pelotas: UFPel**, v. 1, p. 221, 1996.

RIDDELL, Roland W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, v. 42, n. 2, p. 265-270, 1950.

RODRIGO, S. et al. Antagonism between *Byssoschlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*) and plant pathogens: Involvement of the bioactive compounds produced by the endophyte. **Annals of applied biology**, v. 171, n. 3, p. 464-476, 2017.

RODRIGUES, P. M. B.; CUNHA, M. G. C. Produção de protease pelo *Penicillium aurantiogriseum* URM4622. 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

ROVEDA, Mirela et al. Produção de lipases por microrganismos isolados de efluentes de laticínios através de fermentação submersa. 2007.

SAMSON, R. A., FRISVAD, J. C. *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. **Studies in Mycology (Baarn)** v.28. n.1 p. 46-54. 2011.

SAMSON, R.A. *Paecilomyces* and some allied *Hyphomycetes*. **Stud. Mycol.** 1974, 6, 1–119.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial-vol. 2: engenharia bioquímica**. Editora Blucher, 2001.

SCHROERS, Hans-Josef. A monograph of *Bionectria* (Ascomycota, *Hypocreales*, *Bionectriaceae*) and its *Clonostachys* anamorphs. Utrecht: Centraal bureau voor Schimmelcultures, 2001.

SERRANO-CARREÓN, L. et al. Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. In: *Filaments in Bioprocesses*. **Springer**, Cham, 2015. p. 55-90.

SERYCZYŃSKA, H.; BAJAN, C. Defensive reactions of L3, L4 larvae of the Colorado beetle to the insecticidal fungi *Paecilomyces farinosus* (Dicks) Brown et Smith, *Paecilomyces fumoso-roseus* (Wize), *Beauveria bassiana* (Bols/Vuill.)(Fungi Imperfecti: Moniliales). **Bulletin de l'Academie polonaise des sciences**. Serie des sciences biologiques, v. 23, n. 4, p. 267, 1975.

SGARBIERI, Valdemiro Carlos. Revisão: Propriedades estruturais e físico-químicas das proteínas do leite. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 1, p. 43-56, 2005.

SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. *International journal of biological macromolecules*, v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHARMA, Kanupriya Miglani et al. Microbial alkaline proteases: Optimization of production parameters and their properties. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 115-126, 2017.

SILVA, Caroline Targino Alves da. Atividade proteolítica e especificidade de fungos filamentosos entomopatogênicos sobre a lagarta da maçã do algodoeiro *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae). Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2018.

SILVA, José Vinícius da et al. Estudo de alterações metabólicas nos fungos endofíticos *Penicillium brasilianum* e *Penicillium griseoroseum*. 2011.

SILVA, Maria de Lourdes Corradi da et al. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*, p. 85-92, 2006.

SIMONAZZI, A. et al. Evaluación de formulaciones oleosas de *Beauveria bassiana* utilizando Poloxamer 407 para el desarrollo de un potente bioinsecticida para el control del vector de la enfermedad de Chagas. In: JORNADAS DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE FACULTADES DE INGENIERÍA DEL NOA, 10., 2015, Salta. **Artigo...** Salta, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/294089509_Evaluacion_de_formulaciones_

oleosas_de *Beauveria bassiana* utilizando Poloxamer 407 para el desarrollo de un potente bioinsecticida contra el vector de la enfermedad de Chagas.

SINDHU, R.; SUPRABHA, G. N.; SHASHIDHAR, S. Optimization of process parameters for the production of alkaline protease from *Penicillium godlewskii* SBSS 25 and its application in detergent industry. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 9, p. 515-522, 2009.

SINGH, Rajendra et al. Microbial proteases in commercial applications. **J Pharm Chem Biol Sci**, v. 4, n. 3, p. 365-74, 2016.

SINHA, K. K., CHOUDHARY, A. K., & KUMARI, P. (2016). Entomopathogenic Fungi. *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, 475–505.

SOMERS, E. The toxic potential of trace metals in foods. A review. **Journal of Food Science**, v. 39, n. 2, p. 215-217, 1974.

SOUZA, P. M. D. et al. A biotechnology perspective of fungal proteases. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 337-346, 2015. ISSN 1517-8382.

STEINBERG, Gero. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. **Eukaryotic cell**, v. 6, n. 3, p. 351-360, 2007.

SUETSUNA, Kunio. Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 9, n. 7, p. 415-419, 1998.

SUMANTHA, Alagarsamy; LARROCHE, Christian; PANDEY, Ashok. Microbiology and industrial biotechnology of food-grade proteases: a perspective. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 211, 2006.

SUN, Bing-Da; LIU, Xing-Zhong. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. **Applied soil ecology**, v. 39, n. 1, p. 100-108, 2008.

SUTTON, John C. et al. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. **Plant disease**, v. 81, n. 4, p. 316-328, 1997.

TAKAHASHI, Kenji; CHANG, Wen-Jong. The structure and function of acid proteases. **The Journal of Biochemistry**, v. 80, n. 3, p. 497-506, 1976.

TOLEDO, A. V. et al. First record of *Clonostachys rosea* (Ascomycota: *Hypocreales*) as an entomopathogenic fungus of *Oncometopia tucumana* and *Sonesimia grossa* (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. **Journal of invertebrate pathology**, v. 92, n. 1, p. 7-10, 2006.

TORRES-BARAJAS, L. R., AGUILAR-OSORIO, G. Xylanolytic system proteins desorption from *Aspergillus flavipes* FP-500 cultures with agrowastes. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 12, n. 3, p. 513-525, 2013.

TREMACOLDI, Célia Regina. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas. **Embrapa Amazônia Oriental-Documentos (INFOTECA-E)**, 2009.

UNIVERSIDAD OF ADELAIDE. **Penicillium**. Micology Online, Austrália do Sul. Disponível em: <<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/penicillium/>>. Acesso em: 21 de agosto de 2020.

VÁSQUEZ, P. C. H. Cinética de inibição por produto e substrato da hidrólise do bagaço de Cana-De-Açúcar. 2017. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

VEITER, Lukas; RAJAMANICKAM, Vignesh; HERWIG, Christoph. The filamentous fungal pellet—relationship between morphology and productivity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 102, n. 7, p. 2997-3006, 2018.

VICCINI, G. Avaliação da eficácia dos esporos do fungo *Clonostachys rosea* e caracterização bioquímica e estrutural de seus polissacarídeos. 2009. Tese (Doutorado em Ciências – Bioquímica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VIVAS, Claudia Moraes. Ensaio enzimáticos com serino proteases: a) calicreína tecidual do rato; b) β -tripsina bovina. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

VOGEL, A. I. Química Orgânica-Análise Orgânica Qualitativa, Vol. 1. Ao Livro Técnico (Rio de, p. 423, 1971.

WADA, Sanae et al. Differences in the susceptibility among silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: *Bombycidae*), strains to the entomopathogenic fungus, *Beauveria brongniartii* and the mode of inheritance of the susceptibility. **Journal of insect biotechnology and sericology**, v. 79, n. 3, p. 3_103-3_110, 2011.

WADA, Sanae et al. Immune response in the hemocyte after phagocytosis influences the infection with *Beauveria brongniartii* to the silkworm, *Bombyx mori*. **Journal of Insect Biotechnology and Sericology**, v. 85, n. 3, p. 3_055-3_065, 2016.

WAGENINGEN UNIVERSITY. **Süt proteinleri**. Food-info, Wageningen, 01 jul 2017. Disponível em: <<http://www.food-info.net/tr/protein/milk.htm>>. Acesso em: 21 de agosto de 2020.

WARD, O. P., RAO, M. B., & KULKARNI, A. (2009). Proteases. In Schaechter, M. (Ed.), **Encyclopedia of Microbiology** (pp. 495-511). Amsterdam: Elsevier.

WILSON, K; WALKER, J. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7. ed. Cambridge university press, 2010.

WU, Jianhui et al. Matrine enhances the pathogenicity of *Beauveria brongniartii* against *Spodoptera litura* (Lepidoptera: *Noctuidae*). **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 1812, 2019.

YU, Hongchun et al. Biological activity assay of main *Noctuida noctuidae* pests on MabNPV. **Journal of Northeast Agricultural University**, n. 4, p. 3, 2017.

ZANPHORLIN, L. M. et al. Purification and characterization of a new alkaline serine protease from the thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 2137-2143, 2011.

ZAPATA, C. J. Guia ilustradade hongos promisorios para el controle de malezas, insectos, nematodos y hongos fitopatógenos. 1. ed. Manizales: Editorial Universidad de Caldas, 2005.

ZEILINGER, S. et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*—chemistry meets genomics. *Fungal biology reviews*, v. 30, n. 2, p. 74-90, 2016.

ZERVA, Anastasia et al. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. **Bioresource technology**, v. 162, p. 294-299, 2014.

ZHAO, M. L. et al. A potential virulence factor involved in fungal pathogenicity: serine-like protease activity of nematophagous fungus *Clonostachys rosea*. **Fungal Divers**, v. 19, p. 217-234, 2005.

ZIMMERMANN, Gisbert. Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 17, n. 6, p. 553-596, 2007.