



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
(Associação Ampla entre a UNICENTRO e a UEPG)

THAIANE PROLO

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASES: POTENCIAL  
PROTEOLÍTICO DE *Fusarium oxysporum*

Guarapuava

2015

THAIANE PROLO

BIOPROSPECÇÃO DE FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASES: POTENCIAL  
PROTEOLÍTICO DE *Fusarium oxysporum*

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Knob.

Co-orientador: Prof. Dr. Vanderlei Aparecido de Lima.

Guarapuava

2015

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

P964b Prolo, Thaianie  
Bioprospecção de fungos produtores de proteases: potencial proteolítico de  
*Fusarium oxysporum* / Thaianie Prolo. -- Guarapuava, 2015  
xiv, 98 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva,  
2015

Orientadora: Adriana Knob  
Co-orientador: Vanderlei Aparecido de Lima  
Banca examinadora: Adriana Knob, Ana Flora Adalberto Vasconcelos, Patrícia  
Carla Giloni de Lima, Rosilene Rebeca (suplente)

Bibliografia

1. Ciências biológicas. 2. Biologia evolutiva. 3. Protease alcalina. 4. Pelo de  
cachorro. 5. Linhagens fúngicas. 6. Metodologia de superfície de resposta. I. Título. II.  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

CDD 575

THAIANE PROLO

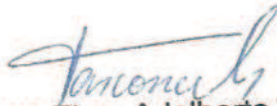
**“Bioprospecção de fungos produtores de proteases: potencial proteolítico de *Fusarium oxysporum*.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva”, no Programa de Pós-graduação em Biologia Evolutiva, da Universidade Estadual de Centro-Oeste, pela comissão formada pelos professores:



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Knob

(Universidade Estadual do Centro-Oeste UNICENTRO)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Flora Adalberto Vasconcelos  
(UNESP – Presidente Prudente)



Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Carla Giloni de Lima  
(Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO)

Guarapuava, 13 de fevereiro de 2015.

**Dedico à Tania Aurora Ferraz Prolo, minha mãe e aurora da minha vida. E ao Sérgio Luiz Prolo Júnior, meu irmão, por me despertar a paixão pela Biologia.**

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela oportunidade de realização do curso.

Em especial à Professora Dra. Adriana Knob, não tenho como expressar minha gratidão pela paciência e atenção em me ensinar todos os passos, sendo uma amiga, orientadora, conselheira e ouvinte.

À minha família por me dar suporte e apoio para que eu nunca desistisse.

Às minhas amigas de longa data que, desde o ensino fundamental, sempre acreditaram que podemos ir mais longe do que sonhamos.

Aos meus amigos e colegas de turma por tornarem as atividades mais animadas e proveitosas.

Às minhas amigas, Samara e Simone, por serem colegas de trabalho, parceiras de estudos e companheiras de risadas.

Ao Cristian, pelo carinho, apoio e paciência nestes dois anos.

Aos meus companheiros de laboratório: Simone, Thaís, Márcio, Janaína, Diana, Maíra, Michael e Mariane, pela amizade, ensinamentos e bons momentos de descontração. E aos companheiros de outros laboratórios que estavam sempre presentes.

À todos meus colegas e amigos pela paciência e compreensão da minha ausência durante esses dois anos.

Aos funcionários dos diversos departamentos da faculdade, secretários, estagiários, técnicos, serviços gerais e vigias.

Ao Professor Vanderlei pela atenção e dedicação em passar o máximo de conhecimento e pelas contribuições neste trabalho.

À Professora Patrícia pelas conversas e conselhos.

Ao Professor Paulo Roberto por deixar seu laboratório a disposição, assim como as técnicas, e os demais alunos do laboratório que sempre estavam presentes.

À todos os professores do DEBIO, por cada ajuda, conselho, palestra e conversa, tudo veio a acrescentar para a realização deste trabalho.

À todos os *pet shops* que cederam os pelos para a realização do trabalho.

À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente nessa caminhada.

**Muito Obrigada!**

“Dificuldades impedem o progresso daqueles que são fracos. Para o forte, no entanto, elas são uma oportunidade de abrir as portas para um futuro brilhante. Tudo é determinado pela nossa atitude, a nossa determinação.”

(Daisaku Ikeda)

## Resumo

As proteases constituem um dos mais importantes grupos enzimáticos comerciais, representando cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. Dentre suas principais aplicações biotecnológicas, podem ser citadas suas utilizações nas indústrias de detergentes, couro, alimentos, entre outros. O presente estudo teve como objetivo selecionar fungos produtores de proteases. Para tal, 73 espécies fúngicas foram avaliadas, sendo 35 leveduras e 38 fungos filamentosos. Após uma seleção inicial, o efeito de diversos parâmetros físico-químicos sobre a produção de proteases pela linhagem previamente selecionada e posteriormente identificada como *Fusarium oxysporum* foi investigado, empregando-se pelo de cachorro nas colorações branca e preta como substratos. Os experimentos foram realizados em Delineamento Central Composto Rotacional aplicável à Metodologia de Superfície de Resposta. As proteases produzidas foram caracterizadas bioquimicamente, sendo determinados os seguintes parâmetros: temperatura ótima, pH ótimo, termoestabilidade, estabilidade em diferentes pH e a influência de íons e outras substâncias. Dentre as linhagens fúngicas avaliadas, *F. oxysporum* foi a que produziu os maiores níveis de proteases alcalinas, quando cultivada em pelo de cachorro na coloração preta. Níveis máximos de produção foram alcançados quando o pH do meio foi ajustado para 4,2, concentração do substrato de 4,2 % e o tempo de cultivo de 8,6 dias, correspondendo a 72,8 U mL<sup>-1</sup>. Quando cultivado em pelo de cachorro na coloração branca, os níveis máximos de produção foram obtidos em pH do meio ajustado para 6,0, concentração de substrato 5,0 % e tempo de cultivo de 6,5 dias, correspondendo a 51,84 U mL<sup>-1</sup>. Os níveis de produtividade obtidos empregando-se o pelo branco e o pelo preto como substratos corresponderam a um aumento de 14,85 e 7,19 vezes, respectivamente, em relação a atividade inicialmente observada. As duas enzimas produzidas apresentaram propriedades desejáveis em diferentes aplicações industriais, como relativa termoestabilidade e atuação em uma ampla faixa de pH. Assim, o pelo de cachorro é um resíduo promissor para produção de proteases alcalinas, nas duas colorações testadas, por ser um substrato de baixo custo e gerado em grandes quantidades por *pet shops* no mundo todo.

**Palavras-chave:** Protease alcalina, pelo de cachorro, linhagens fúngicas, metodologia de superfície de resposta.



## Abstract

The proteolytic enzymes are one of the most important groups of commercial enzymes, representing about 60% of the global market for enzymes. Among the biotechnological applications of proteases, can be mentioned their application in detergents, leather, food, and other industries. The objective of this study was selection fungal that was better protease producers. To this, 73 fungal species were evaluated, 35 yeasts and 38 filamentous fungi. After an initial selection, the effect of various physico-chemical parameters on proteases production by the strain previously selected and subsequently identified as *Fusarium oxysporum* was investigated, using dog hair in white and black colors as substrates. The experiments were performed using Central composite rotational design applicable to Response Surface Methodology. Proteases produced were biochemically characterized, determining the following parameters: optimum temperature, optimum pH, thermostability, stability at different pH and the influence of ions and substances. Among the evaluated fungal strains, *F. oxysporum* produced the highest levels of alkaline protease when its was grown in black dog hair. Maximum production levels were achieved when the pH of medium was adjusted to 4.2, substrate concentration was 4.2% and the cultivation time was 8.6 days, corresponding to 72.8 U mL<sup>-1</sup>. When it was grown in white dog hair, maximum production levels were obtained in pH of medium adjusted to 6.0, on substrate concentration of 5.0% and cultivation time of 6.5 days, corresponding to 51.84 U mL<sup>-1</sup>. Productivity levels obtained employing white and black dog hair as substrates correspond an increase of 14.85 and 7.19 fold, respectively, in relation to the initial activity observed. Both enzymes exhibited desirable properties to be apply in many industries, such as relative thermal stability and action in a wide pH range. Thus, dog hair is a promising residue for alkaline proteases production, in both colors that were tested, due to be a low cost material and generated in large amounts by pet shops throughout the world.

**Key-words:** Alkaline protease, dog hair, fungal strains, response surface methodology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1. Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um fio de cabelo humano. .... 21
- Figura 2. Estrutura da proteína queratina (estrutura  $\alpha$ )..... 23
- Figura 3. Classificação das peptidases de acordo com tipo de reação catalisada..... 28
- Figura 4. *F. oxysporum*. A - B: Macroconídias; C - D: Microconídias; E - F: Microconídias *in situ* em meio ágar-folha. A - D, barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ ; E-F, barra de escala: 50  $\mu\text{m}$ . .... 35
- Figura 5. Micromorfologia de fungo *F. oxysporum*, microcultivo em meio Vogel (1956), a 28 °C, após sete dias de cultivo. A-B: Hifas, conidióforos e microconídios; C: Filiades; D: Conidióforos e aglomerações de esporos (cabeça de esporos). Resolução. A - B 4x; C 100x; D 40x. .... 35
- Figura 6. Morfologia macroscópica da cultura de *F. oxysporum*, em meio Vogel (1956), a 28 °C, após sete dias de incubação. .... 36

### CAPÍTULO II

- Figure 1. Fitted response-surface contour plots for enzymatic activity as a function of cultivation time and substrate concentration (A), medium pH and substrate concentration (B) and medium pH and cultivation time (C) on alkaline protease production by *F. oxysporum* using white dog hair as substrate. .... 67
- Figure 2. Scanning electron microscopy of dog hair. Figures shows control hair, which was not applied treatment (A, B and C) and degraded hair fibers by *F. oxysporum* on submerged cultivation after 6.5 days (D, E and F). .... 68
- Figure 3. Influence of temperature (A) and pH (B) on alkaline protease activity. Plates C and D represent thermal and pH stability of this enzyme. .... 69

### CAPÍTULO III

- Figure 1. Fitted response-surface contour plots of central composite design for alkaline protease production by *F. oxysporum*. Figures shows the interaction cultivation time and substrate concentration (A), medium pH and substrate concentration (B) and medium pH and cultivation time (C)..... 86
- Figure 2. Scanning electron microscopy of dog hair. Figures shows control hair, that was indigested (A, B and C) and hair that was digested by *F. oxysporum* on submerged cultivation from 8.6 days. It can be seen the colonization of fungal on hair surface (D, E and F). .... 87
- Figure 3. Infrared spectra grouped by means of FTIR, samples of black dog hair. .... 88
- Figure 4. Influence of temperature (A) and pH (B) on alkaline protease activity from *F. oxysporum*. Plates C and D represent thermal and pH stability of this enzyme..... 89

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1. Perfil de aminoácidos presentes no cabelo humano. ....	22
Tabela 2. Caracterização físico-química de pelo de porco. ....	22
Tabela 3. Aspectos de produção enzimática de proteases pelas diferentes fontes de obtenção. ....	30
Tabela 4. Principais microrganismos produtores de proteases e substratos empregados na produção. ....	31
Tabela 5. Aplicações industriais de proteases microbianas. ....	33

### CAPÍTULO I

Tabela 1. Linhagens testadas de fungos filamentosos e leveduriformes isolados a partir de diferentes ambientes. ....	46
Tabela 2. Seleção inicial de leveduras produtoras de proteases, isoladas a partir de diferentes ambientes. ....	47
Tabela 3. Seleção inicial de fungos filamentosos produtores de proteases neutras. ....	48
Tabela 4. Produção de proteases neutras por fungos filamentosos, empregando-se 1% (m/v) de pelo de cachorro na coloração preta como substrato. ....	49
Tabela 5. Avaliação da atividade proteásica neutra e alcalina dos fungos BV e D03, empregando-se 1% (m/v) de pelo de cachorro nas colorações preta e branca. ....	50

### CAPÍTULO II

Table 1. Experimental design used in RSM studies using three independent variables (real encoded values) of protease production by <i>F. oxysporum</i> . ....	64
Table 2. ANOVA for the regression model and the estimated regression coefficient with corresponding <i>p</i> values representing alkaline protease activity. ....	65
Table 3. Effect of different substances on proteolytic activity of <i>F. oxysporum</i> . ....	66

### CAPÍTULO III

Table 1. Experimental conditions and results of the statistical experimental design for protease production by <i>F. oxysporum</i> . .....	83
Table 2. ANOVA for the model regression and estimated regression coefficient values for protease production by <i>F. oxysporum</i> . .....	84
Table 3. Effect of different substances on proteolytic activity from <i>F. oxysporum</i> . .....	83

## LISTA DE SIGLAS

**%:** porcentagem

**°C:** graus Celsius

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**Art:** Artigo

**Asp:** ácido aspártico

**CCRD:** Central Composite Rotary Design

**CFMV:** Conselho Federal de Medicina Veterinária

**cm:** centímetros

**Cys:** cisteína

**DCCR:** Delineamento Central Composto Rotacional

**DMSO:** dimethylsulfoxide

**DRIFTS:** Diffuse Reflection Infrared Fourier Transform Spectroscopy

**E.C.:** Enzyme Commission

**EDTA:** ácido etilenodiaminotetracético

**EGTA:** ácido etilenogliceroltetraacético

**g:** rotações por minuto

**g:** grama

**Gln:** glutamina

**Glu:** ácido glutâmico

**h:** hora

**His:** histidina

**IE:** índice enzimático

**FTIR:** Fourier Transform Infrared Spectroscopy

**L:** litro

**m:** massa

**M:** molar

**mg:** miligrama

**min:** minutos

**mL:** mililitros

**mM:** milimolar

**MSR:** Metodologia de Superfície de Resposta

**n°:** número

**nm:** nanômetros

**OP:** 1,10-orto fenantrolina

**pH:** potencial hidrogeniônico

**PNRS:** Política Nacional de Resíduos Sólidos

**RDC:** Resolução da Diretoria Colegiada

**RSM:** Response Surface Methodology

**RSS:** Resíduos de Serviço de Saúde

**SDS:** dodecil sulfato de sódio

**SEM:** Scanning Electron Microscopy

**T ½:** meia vida

**TCA:** ácido tricloroacético

**Thr:** treonina

**Try:** triptofano

**U:** Unidade enzimática

**v:** volume

**w:** massa

**x. g:** rotações por minuto

**α:** alfa

**β:** beta

**μmol:** micro mol

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1 GERAL: .....	18
2.2 ESPECÍFICOS: .....	18
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1 DESCARTE DE RESÍDUOS SÓLIDOS: UMA PROBLEMÁTICA ACERCA DOS PELOS DE CACHORRO .....	19
3.2 PELO E CABELO DE CACHORRO: ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO .....	20
3.3 MICRORGANISMOS QUERATINOLÍTICOS .....	24
3.4 BIOPROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS PRODUTORES DE PROTEASES .....	25
3.5 PROTEASES .....	27
3.5.1 <i>Classificação</i> .....	28
3.5.2 <i>Fontes de obtenção de proteases</i> .....	29
3.5.3 <i>Importância industrial das proteases</i> .....	32
3.6 <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> .....	34
3.7 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA .....	36
<b>4. CAPÍTULO I</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
4.2.1 MICRORGANISMOS.....	40
4.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE PROTEÁSICA .....	40
4.2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	40
4.2.4 SELEÇÃO INICIAL DE LEVEDURA .....	40
4.2.5 SELEÇÃO INICIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS .....	41
4.2.6 SELEÇÃO DOS MELHORES FUNGOS PRODUTORES DE PROTEASES EM PELO DE CACHORRO .....	41
<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>41</b>
4.3.1 SELEÇÃO INICIAL DE FUNGOS LEVEDURIFORMES PRODUTORES DE PROTEASES .....	41
4.3.2 SELEÇÃO INICIAL DE FUNGOS FILAMENTOSOS PRODUTORES DE PROTEASES .....	42
4.3.3 SELEÇÃO DAS LINHAGENS MELHORES PRODUTORAS DE PROTEASES EMPREGANDO-SE PELO DE CACHORRO COMO SUBSTRATO .....	42
<b>4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>43</b>
<b>4.5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>5. CAPÍTULO II</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1 INTRODUCTION</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2 MATERIAL AND METHODS</b> .....	<b>53</b>
5.2.1 DOG HAIR RESIDUE .....	53
5.2.2 MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS.....	53

5.2.3 ENZYMATIC ASSAY .....	54
5.2.4 EXPERIMENTAL DESIGN FOR ALKALINE PROTEASE PRODUCTION .....	54
5.2.5 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM) IMAGES .....	55
5.2.6 ENZYME CHARACTERIZATION .....	55
5.2.6.1 <i>Optimum temperature and pH</i> .....	55
5.2.6.2 <i>Protease thermostability and pH stability</i> .....	55
5.2.6.3 <i>Effect of metallic ions and other compounds</i> .....	55
<b>5.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>56</b>
5.3.1 PROCESS OPTIMIZATION OF ALKALINE PROTEASE PRODUCTION BY <i>F. OXYSPORUM</i> USING RSM BASED ON CCRD .....	56
5.3.2 DOG HAIR DEGRADATION BY <i>F. OXYSPORUM</i> .....	58
5.3.3 ENZYME CHARACTERIZATION .....	58
<b>5.4. CONCLUDING REMARKS .....</b>	<b>60</b>
<b>5.5 ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>60</b>
<b>5.6 REFERENCES .....</b>	<b>60</b>
<b>6. CAPÍTULO III .....</b>	<b>70</b>
<b>6.1 INTRODUCTION .....</b>	<b>71</b>
<b>6.2 MATERIAL AND METHODS.....</b>	<b>72</b>
6.2.1 RESIDUE MATERIAL.....	72
6.2.2 MICROORGANISM AND CULTURE CONDITIONS.....	72
6.2.3 ENZYMATIC ASSAY .....	72
6.2.4 OPTIMIZATION OF ALKALINE PROTEASE PRODUCTION .....	72
6.2.5. SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM) IMAGES .....	73
6.2.6. DOG HAIR CHARACTERIZATION USING FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR).....	73
6.2.7.1 <i>Optimum temperature and pH</i> .....	74
6.2.7.2 <i>Protease thermostability and pH stability</i> .....	74
6.2.7.3 <i>Effect of metallic ions and other compounds on protease activity</i> .....	74
<b>6.3 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>74</b>
6.3.1 OPTIMIZATION OF <i>F. OXYSPORUM</i> PROTEASE PRODUCTION USING RESPONSE SURFACE METHODOLOGY.....	74
6.3.2 SEM OF DOG HAIR DEGRADATION BY <i>F. OXYSPORUM</i> .....	77
6.3.3 DOG HAIR CHARACTERIZATION BY FTIR ANALYSES.....	77
6.3.4 ENZYME CHARACTERIZATION .....	77
<b>6.4 CONCLUDING REMARKS .....</b>	<b>79</b>
<b>6.5 ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>79</b>
<b>6.6 REFERENCES .....</b>	<b>79</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>
<b>8. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>91</b>



## 1. Introdução

As proteases estão dentre as enzimas comerciais mais vendidas em todo o mundo, representando cerca de 1/3 de todo o mercado mundial. De modo geral, estas enzimas possuem uma ampla aplicabilidade e especificidade, sendo amplamente utilizadas nas mais diversas aplicações industriais.

As enzimas com atividade proteolítica pertencem à classe das hidrolases, apresentando atividade ótima em diferentes valores de pH. Especificamente, as proteases conhecidas como alcalinas são as que possuem maior atividade enzimática em valores de pH acima de 8,0; sendo preferencialmente aplicadas nas indústrias de couros e de detergentes. Porém, em geral, as proteases também são amplamente empregadas nas indústrias farmacêutica, de cosméticos, de química fina e de alimentos.

Atualmente, em todo o mundo, há uma grande pressão sobre as indústrias para que estas reduzam os impactos causados ao meio ambiente. Nesse sentido, a tecnologia enzimática é de interesse, em função da tendência ecológica e renovável, bem como pela demanda de processos mais eficientes e economicamente viáveis.

O emprego de enzimas nos processos industriais ajuda na redução dos custos de produção, conferindo uma melhora ao produto final. Adicionalmente, podem conferir um aumento na produtividade e uma redução do tempo de produção, além de diminuir os impactos ambientais, por serem normalmente usadas em substituição a produtos químicos. Neste contexto, a tecnologia enzimática pode promover, significativamente, a produtividade e sustentabilidade de diversos segmentos industriais.

A obtenção de enzimas por meio de microrganismos pode demandar, em muitos casos, a suplementação dos meios de cultivo, bem como o emprego de substratos indutores purificados, os quais podem conferir um aumento significativo no custo total da produção enzimática. Por esta razão, existe a necessidade de se buscar novas metodologias envolvendo o emprego de fontes alternativas de substratos, que apresentem menor custo e que sejam eficientes em induzir a produção destas enzimas, dispensando as suplementações.

A queratina é o principal componente do pelo, caracterizada por apresentar uma estrutura proteica insolúvel, altamente complexa e de difícil degradação. A fim de degradar a queratina, a secreção de enzimas extracelulares e altamente específicas por parte dos microrganismos é necessária. Na natureza, os microrganismos que degradam tal estrutura são conhecidos como queratinolíticos. Esses microrganismos normalmente possuem grande plasticidade de crescimento em diferentes condições ecológicas e ambientais, apresentando

uma capacidade de degradação da queratina variável. A síntese de proteases extracelulares viabiliza a hidrólise da queratina, permitindo a assimilação de nutrientes, a partir desta proteína.

Estima-se que o Brasil possua, em média, 106 milhões de animais domésticos. Grande parcela deste número demanda cuidados especializados, nos chamados *pet shops*, que são os comércios que oferecem serviços de banho, tosa, vacinação e consultas. Estes locais geram uma grande demanda de descarte de resíduos potencialmente contaminantes, estando entre eles os pelos dos cachorros, resultantes dos serviços de tosa. Estes pelos podem ser veículos para diversos patógenos como microrganismos e outros. Desta forma, quando descartados de forma inadequada, podem oferecer riscos aos outros seres vivos. Diante desta problemática, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe de um regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos potencialmente contaminantes, oferecendo como alternativa segura a incineração do resíduo biológico animal, ou então o acondicionamento eficiente destes resíduos em embalagens e posterior descarte em aterros, o que gera custos aos estabelecimentos que necessitam de tal serviço.

Considerando os dados apresentados, o emprego do pelo de cachorro nos processos de produção de enzimas proteolíticas é uma alternativa interessante de ser avaliada, pois além de evitar os riscos que este resíduo pode causar ao meio ambiente em decorrência de sua deposição inadequada na natureza, pode ainda contribuir para a redução dos custos de produção enzimática.

## 2. Objetivos

### 2.1 Geral:

O objetivo geral deste estudo foi selecionar fungos produtores de proteases alcalinas, empregando-se o pelo de cachorro como substrato. Objetivou-se ainda estabelecer as melhores condições físico-químicas para a produção destas enzimas pela melhor linhagem produtora, bem como caracterizá-las bioquimicamente.

### 2.2 Específicos:

1. Selecionar fungos potencialmente produtores de proteases alcalinas;
2. Avaliar o pelo de cachorro nas colorações preta e branca como substratos alternativos para a produção de proteases fúngicas;
3. Avaliar a composição química do pelo de cachorro por meio da análise de espectros de infravermelho;
4. Estabelecer os parâmetros físico-químicos ótimos para a produção de proteases alcalinas pelo fungo previamente selecionado *Fusarium oxysporum*, usando o pelo de cachorro nas colorações preta e branca e o delineamento central composto rotacional aplicável à metodologia de superfície de resposta;
5. Determinar o pH e a temperatura ótimos das proteases produzidas por *F. oxysporum*, bem como verificar a estabilidade destas enzimas frente à temperatura e ao pH;
6. Avaliar o efeito de íons metálicos e de outras substâncias sobre a atividade das proteases;
7. Demonstrar os efeitos da degradação do pelo de cachorro pelo fungo *F. oxysporum*, empregando-se a microscopia eletrônica de varredura.

### 3. Revisão bibliográfica

#### 3.1 Descarte de resíduos sólidos: uma problemática acerca dos pelos de cachorro

O Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV) entende por *pet shops* os locais que oferecem serviços de banho, tosa e venda de produtos. Esses estabelecimentos estão presentes em todos os municípios, independente do seu porte. Atualmente, o Brasil apresenta em média 106 milhões de animais domésticos. Devido a esse número, a demanda por *pet shops* tem aumentado significativamente nos últimos anos. Acompanhando este crescimento, a quantidade de resíduos gerados por esses estabelecimentos também aumenta. Por esta razão, a destinação de rejeitos acumulados nos *pet shops* se tornou motivo de preocupação das autoridades, para que estes recebam destinação correta, evitando veiculação de possíveis contaminantes biológicos (CFMV, 2013; CRMV-MG, 2013).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe sobre o regulamento técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. A mesma define como geradores de resíduos de serviço de saúde (RSS) todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana e animal, incluindo os serviços de *pet*. A RDC é constituída por um conjunto de procedimentos de gestão e planejamento, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e propiciar um destino adequado, sem risco a saúde e ao meio ambiente. Estes resíduos devem ser adequadamente embalados, etiquetados, armazenados e serem posteriormente descartados. Os resíduos de atenção à saúde animal, como peças anatômicas e resíduo animal potencialmente contaminado, são classificados como grupo “A” que representa: “resíduos com a possível presença de agentes biológicos que, por suas características, podem apresentar risco de infecção” (BRASIL, 2004).

O CFMV (2013) através da resolução nº 1.015, publicada em 09 de janeiro de 2013 que conceitua e estabelece condições para o funcionamento de estabelecimentos médicos veterinários, e dá outras providências, atenta que todo material biológico animal deve ser tratado como possível vinculador de contaminantes. Porém, os pelos não são descritos pela ANVISA como contaminantes, bem como não são enquadrados em nenhum dos grupos de risco. Desta forma, não recebem a atenção devida, sendo descartados juntamente com o lixo doméstico, desconsiderando a possibilidade destes estarem contaminados com microrganismos e outros. Uma alternativa considerada é a incineração do resíduo biológico animal, a fim de reduzir possíveis riscos de veiculação de patógenos e de garantir um destino

eficiente. Outra opção seria embalar o resíduo de forma eficiente e descartá-lo em aterros (FONSECA, 2009).

No Brasil, uma legislação ampla regulamenta o controle do impacto ambiental causado pelo descarte inadequado de resíduos sólidos. Os comércios que oferecem estes tipos de serviço devem se atentar para a lei nº 12.305, de agosto de 2010, que instituiu a Política Nacional de Resíduos Sólidos – PNRS. Segundo o Título I: Disposições Gerais, Capítulo II: Definições, Artigo 3º Para os efeitos desta Lei, entende-se:

“VII - destinação final ambientalmente adequada: destinação de resíduos que inclui a reutilização, a reciclagem, a compostagem, a recuperação e o aproveitamento energético ou outras destinações admitidas pelos órgãos competentes do Sisnama, do SNVS e do Suasa, entre elas a disposição final, observando normas operacionais específicas de modo a evitar danos ou riscos à saúde pública e à segurança e a minimizar os impactos ambientais adversos;”

A lei nº 12.305 também faz a distinção entre resíduo e rejeito, sendo definidos como aquele que pode ser reciclado ou reutilizado e o que não é reaproveitável, respectivamente (BRASIL, 2010).

Contrariamente, a legislação de diversos países no exterior faz a devida menção sobre este tipo de resíduo. Os departamentos responsáveis pela legislação sobre a destinação de resíduos sólidos no Reino Unido (Animal and Plant Health Agency) e na União Europeia (European Union) classificam os pelos de animais como categoria 3, sugerindo seu descarte em aterros adequados ou a incineração destes (APHA, 2014; EUROPEAN UNION, 2002).

### 3.2 Pelo e cabelo de cachorro: estrutura e composição

Algumas raças de cachorros possuem pelagem chamada de cabelos, enquanto que outros possuem os pelos propriamente ditos. No entanto, os dois possuem a mesma composição química. O que determina essa classificação é o crescimento e a textura da pelagem. O ciclo de crescimento do cabelo é maior, bem como um comprimento superior é atingido. Desta forma, os cabelos alcançam a maturidade e caem mais tardiamente. Devido a essa característica, os cabelos também apresentam uma textura mais fina, podendo ser encaracolados ou ondulados. Os pelos são mais curtos, com uma textura mais grossa, e, diferentemente dos cabelos, apresentam um ciclo de crescimento, de maturação e de queda mais curto (VETINFO, 2014).

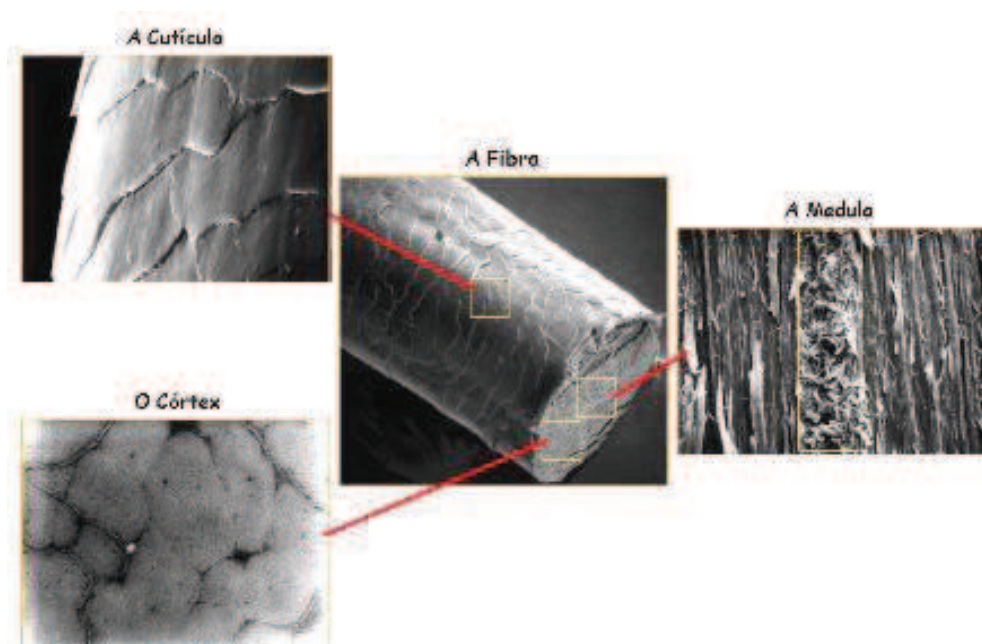
O pelo e o cabelo são compostos por: cutícula, córtex e medula (Figura 1):

- A cutícula é a parte mais externa da fibra do cabelo, formada por células chamadas “escamas”. São estruturas extremamente pequenas e incolores, unidas por lipídios,

sobrepondo-se umas às outras, culminando na formação de camadas constituídas por 3 a 10 células. Seu papel principal é proteger o córtex.

- O córtex é o corpo da fibra, representando cerca de 90% de seu peso total. É formado por células preenchidas por queratina flexível, rica em lipídios. Este é o local onde também estão os grãos de melanina que conferem cor ao cabelo.

- A medula, ou canal medular, situa-se ao centro da fibra e sua presença, geralmente, é descontínua ou até mesmo ausente. Em alguns animais, estas células se degeneram, formando espaços preenchidos de ar, tendo este mecanismo um papel essencial na termorregulação (CARVALHO et al., 2005).



**Figura 1.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura de um fio de cabelo humano.  
**Fonte:** Carvalho et al. (2005).

Quimicamente, cerca de 90% da composição do cabelo humano é constituído por queratina, uma proteína insolúvel em água, responsável pela resistência mecânica e química dos cabelos. Esta é caracterizada pelo seu alto conteúdo de enxofre, derivado da cistina (KAJIURA et al., 2006). Os outros componentes minoritários dos fios, denominados não queratinosos, consistem em partes solúveis em água presentes na estrutura do fio de cabelo como pentoses, fenóis, ácido úrico, glicogénio e diferentes aminoácidos (Tabela 1) (MERSHALL et al., 1991).

**Tabela 1.** Perfil de aminoácidos presentes no cabelo humano.

<b>Aminoácido</b>	<b>(<math>\mu\text{mol g}^{-1}</math> de cabelo seco)</b>	<b>Aminoácido</b>	<b>(<math>\mu\text{mol g}^{-1}</math> de cabelo seco)</b>
<b>Ácido aspártico</b>	292-578	<b>Lisina</b>	130-222
<b>Ácido glutâmico</b>	930-1036	<b>Meia-cistina</b>	1380-1512
<b>Alanina</b>	314-384	<b>Metionina</b>	47-67
<b>Arginina</b>	499-620	<b>Prolina</b>	374-708
<b>Fenilalanina</b>	132-226	<b>Serina</b>	705-1091
<b>Glicina</b>	463-560	<b>Tirosina</b>	121-195
<b>Histidina</b>	40-86	<b>Treonina</b>	588-714
<b>Isoleucina</b>	244-366	<b>Triptofano</b>	20-64
<b>Leucina</b>	489-529	<b>Valina</b>	470-513

Fonte: Adaptado de: Robbins (2002) e Wagner (2006).

Assim como os fios de cabelo, os pelos não são compostos unicamente por proteínas. Segundo a pesquisa realizada por Vázquez et al. (2008), o pelo de porco possui 87,8% de proteína bruta, mas também possui cinzas, gorduras e açúcares totais em sua composição (Tabela 2).

**Tabela 2.** Caracterização físico-química de pelo de porco.

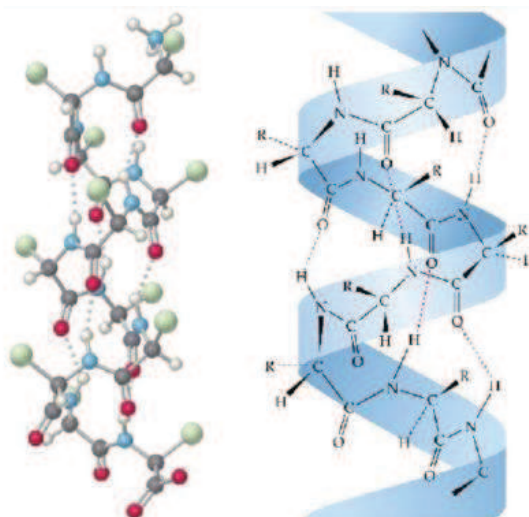
<b>Composição</b>	<b>Quantidade (%)</b>
<b>Umidade</b>	3,20
<b>Matéria seca total</b>	96,80
<b>Cinzas</b>	0,73
<b>Proteína bruta</b>	87,80
<b>Gordura</b>	7,30
<b>Fibra bruta</b>	0,40
<b>Açúcares totais</b>	0,50

Fonte: Vázquez et al. (2008).

As queratinas são polipeptídios formados por 18 tipos de aminoácidos unidos entre si, por meio de ligações peptídicas. Apresentam conformação estrutural helicoidal, originando uma extensa estrutura polimérica condensada, com formação de pontes dissulfeto inter ou intramoleculares. Como resultado, verifica-se uma estrutura de conformação rígida e tenaz, devido à rede tridimensional das fibras de queratina (Figura 2) (ONIFADE et al., 1998; SCHROOYEN et al., 2000).

Quando comparada a outras proteínas fibrosas, tais como o colágeno, a elastina e as proteínas miofibrilares, a principal característica de diferenciação da queratina é a grande ocorrência de resíduos de cisteína. Estes constituem cerca de 7-20% do conteúdo total de aminoácidos, estando normalmente localizados nas regiões terminais das cadeias de proteínas (KATOH et al., 2004; SCHROOYEN et al., 2000).





**Figura 2.** Estrutura da proteína queratina (estrutura  $\alpha$ ).  
**Fonte:** Köhler (2011).

Há dois tipos de queratinas, classificadas quanto a sua atividade:  $\alpha$ -queratina (flexível, cristalina) e  $\beta$ -queratina (resistente, amorfa). A  $\alpha$ -queratina (alfa hélice) mantém esta conformação devido às ligações de hidrogênio presentes entre as duas espirais adjacentes na hélice. As cadeias de proteína na  $\alpha$ -hélice são menores que as encontradas na  $\beta$ -hélice. A  $\alpha$ -queratina está presente principalmente no córtex, enquanto que a  $\beta$ -queratina é encontrada nas camadas mantidas unidas pelas ligações de hidrogênio (DRAELOS, 2000).

As  $\alpha$ -queratinas são encontradas em todos os vertebrados superiores, enquanto as  $\beta$ -queratinas são encontradas exclusivamente em répteis e aves. As  $\beta$ -queratinas são estruturalmente menores que as  $\alpha$ -queratinas (BRUSH, 1996).

Proteínas insolúveis estão presentes por todo o corpo animal, estando a maior parte dessas proteínas presentes nos pelos, ossos, unhas, cascos, órgãos e tecidos. Usualmente, a maior parte desses resíduos são incinerados, sendo este método desvantajoso ecologicamente por produzir uma grande quantidade de dióxido de carbono. Assim, uma alternativa para este descarte é necessária (DEYDIER et al., 2005; SUZUKI et al., 2006).

Uma vez que a queratina é naturalmente transparente, o que confere coloração ao cabelo é a melanina (NOVELINO et al., 2000). Em humanos, normalmente a coloração do cabelo é uniforme da raiz às pontas. Já em animais, um único fio de cabelo pode apresentar diversas cores ao longo de seu comprimento, fenômeno conhecido como bandagem. A melanina no córtex do cabelo humano possui uma maior densidade, embora o pigmento possa se tornar mais denso ao se aproximar da cutícula. A melanina no pelo animal age de maneira oposta, ficando mais densa ao se aproximar da medula, a porção mais interna do pelo (VETINFO, 2014).



A melanina é aleatoriamente distribuída no córtex, na forma de grânulos e representa até 3% do peso seco do cabelo (ROBBINS, 2002). No cabelo humano, sabe-se que existem dois tipos de melanina, a eumelanina (pigmentos marrons e pretos escuros) e a feomelanina (pigmentos vermelhos e loiros), ambas compostas por pigmentos, proteínas e minerais (NOVELINO et al., 2000; ROBBINS, 2002). Em humanos, as diferentes colorações de cabelo são devidas a uma combinação destes pigmentos (KERATIN, 2014).

Devido à dificuldade do isolamento dos grânulos de melanina humanos, a estrutura química das melaninas ainda não está definida. Sabe-se que o tipo e a quantidade de melanina formada nos melanócitos são geneticamente determinados, mas podem também ser influenciados por fatores hormonais e ambientais, incluindo inflamações, gênero, idade e exposição solar (NOVELINO et al., 2000). Similarmente ao verificado para os cabelos humanos, o processo de pigmentação dos pelos de cachorro ainda não está bem elucidado.

### 3.3 Microrganismos Queratinolíticos

Por a queratina ser uma proteína insolúvel, sua degradação requer a atuação de enzimas extracelulares e altamente específicas. Os mamíferos e as aves não produzem enzimas proteolíticas capazes de hidrolisar a queratina. Materiais queratinosos são insolúveis e resistentes à degradação por enzimas proteolíticas como tripsina e pepsina. Esta resistência à ação das peptidases digestivas faz com que o valor nutritivo das queratinas seja extremamente baixo para estes grupos (FARAG; HASSAN, 2004; WILLIAMS et al., 1990).

Apesar da alta complexidade estrutural e estabilidade da queratina, nota-se que não há acúmulo desta substância na natureza. Devido a este fato, sabe-se da existência de microrganismos naturalmente capazes de degradar e utilizar a queratina para seu crescimento. Porém, a degradação microbiana da queratina limita-se a um pequeno número de fungos e bactérias. Estes microrganismos, denominados queratinolíticos, são capazes de produzir enzimas extracelulares que apresentam elevada especificidade pela queratina, as chamadas queratinases (MARCHISIO, 2000).

Os microrganismos queratinolíticos apresentam grande versatilidade de crescimento em diferentes condições ecológicas e ambientais, demonstrando uma capacidade variada de degradação da queratina. Como mencionado anteriormente, a síntese de proteases extracelulares viabiliza a hidrólise e, conseqüentemente, a assimilação de nutrientes (BRANDELLI et al., 2010; FRIEDRICH; KERN, 2003). Geralmente, as enzimas

extracelulares possuem um relevante potencial industrial, devido a sua fácil obtenção e alta especificidade. Por produzirem enzimas com essas características, os microrganismos queratinolíticos tem sido extensivamente investigados, especialmente em relação ao seu potencial de utilização no processamento do couro, na produção de rações, no tratamento e aproveitamento de resíduos da indústria avícola, entre outros (BACH et al., 2012).

As queratinases produzidas por diferentes organismos, em sua maioria, apresentam características comuns. Por meio da análise de suas sequências de aminoácidos, foi possível verificar que um grande número de queratinases pertencem à família das serino-proteases. Adicionalmente, muitos estudos com substratos e inibidores específicos tem revelado que estas enzimas são frequentemente serino ou metalo-proteases (BRANDELLI et al., 2010).

Estas enzimas apresentam especificidade pela queratina. Entretanto, elas também são capazes de degradar proteínas solúveis, como caseína, gelatina e soro albumina bovina. Adicionalmente, também são capazes de hidrolisar proteínas insolúveis, incluindo penas, sedas e lãs (DAROIT; BRANDELLI, 2014; EVANS et al., 2000).

### 3.4 Bioprospecção de microrganismos produtores de proteases

A bioprospecção é definida como o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local. Possui como objetivo principal a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais. Para que tenha credibilidade científica, política e econômica, o processo de bioprospecção deve observar alguns princípios: prevenção, preservação, equidade distributiva, participação pública, publicidade, controle público e privado e compensação. Dentre as vantagens que podem ser conferidas pelo processo de bioprospecção, podem ser mencionadas o conhecimento da biodiversidade e seu potencial em fornecer substâncias importantes ao ser humano (SANTOS, 2014).

A tecnologia enzimática é hoje um dos campos mais promissores dentro das novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. Em busca de seres com grande capacidade de produção destes compostos, muitos microrganismos já foram isolados na natureza (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; LI et al., 2013; TAVANO, 2013). Porém, a maioria deles ainda não foi devidamente explorada, não revelando seu potencial de produção de compostos. Mesmo que diversas linhagens já tenham sido testadas e melhoradas geneticamente em laboratório, sempre existe a possibilidade de que possa haver na natureza

uma linhagem com maior potencial enzimático ainda não explorada (BRAVO et al., 2000; SILVA et al., 1997).

A busca por microrganismos, geralmente, resulta no isolamento destes a partir de recursos naturais, como solo, água, plantas e no ambiente de modo geral. A obtenção de novas linhagens de interesse industrial é uma atividade de grande importância. Entretanto, por se tratar de uma atividade que envolve muito trabalho experimental, possui um custo relativamente elevado. Apesar dos intemperes, o custo-benefício pode ser vantajoso uma vez que conduz ao isolamento de linhagens melhor produtoras de um dado produto e até conduzir à descoberta de novos produtos (SOARES et al., 2010).

A aplicação de bactérias, leveduras e fungos filamentosos nos processos industriais tem resultado em uma indústria extremamente diversificada e com grandes rendimentos econômicos (SOARES et al., 2010). As enzimas de origem microbiana apresentam enormes vantagens em relação às equivalentes de origem animal ou vegetal. Estas possuem um menor custo de produção e facilidade de produção em larga escala. Suas características físico-químicas são bastante diversificadas, estando geralmente relacionadas ao hábitat e à fisiologia do microrganismo produtor. Ressalta-se ainda a possibilidade de manipulação genética dos microrganismos, a fim de se elevar os níveis de enzimas produzidos (OLIVEIRA et al., 2006). Portanto, o isolamento e a identificação de novas fontes microbianas se faz necessário, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, torna possível a descoberta e o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (ALVES et al., 2002).

Para que o processo de produção industrial de enzimas microbianas seja eficiente, espera-se que o microrganismo produtor apresente as seguintes características gerais (RODARTE, 2005; STANBURY et al., 1995):

- a) não ser patogênico e ou toxigênico;
- b) apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto;
- c) permitir o acúmulo do produto no meio;
- d) não produzir metabólitos secundários que possam interferir no produto;
- e) apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico;
- f) não exigir condições de processos complexos;
- g) não exigir meios de cultura caros;
- h) permitir a rápida liberação do produto para o meio.

Diversos trabalhos têm sido relatados na literatura, envolvendo a bioprospecção de microrganismos para a produção de proteases. Estes microrganismos têm sido isolados a

partir de diversos ambientes, incluindo o solo, plantas, águas residuais, resíduos industriais sólidos entre outros (ABIDI et al., 2011; GUPTA et al., 2012; HASSAN et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; SHANKAR et al., 2011).

### 3.5 Proteases

Do ponto de vista industrial, as enzimas são muito importantes, por apresentarem características físico-químicas específicas, atuarem de forma eficiente e controlada em uma determinada reação, além de possuírem especificidade por diferentes substratos, os quais influenciam diretamente na atividade da enzima. Adicionalmente, as enzimas apresentam baixa toxicidade, sendo uma opção segura para o amplo emprego em processos industriais (SANCHEZ; DEMAIN, 2011).

Dentre as enzimas mais vendidas no mundo, estão as hidrolases; enzimas que catalisam a quebra de seus substratos na presença de moléculas de água. As hidrolases englobam diversas enzimas, destacando-se industrialmente as carboidrases, lipases e proteases (CHANALIA et al., 2011; PARANTHAMAN et al., 2009; RAO et al., 2009).

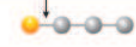

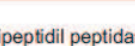





As proteases são uma classe única de enzimas bastante importante em relação a sua aplicabilidade industrial, atuação em processos fisiológicos, biotecnológicos, entre outros (RAGHUNATH; BADGUIAR, 2010; RAO et al., 1998). Estas enzimas possuem a capacidade de hidrolisar ligações peptídicas em proteínas e fragmentos de proteínas, causando alterações irreversíveis ou degradação destes substratos. São fisiologicamente importantes para a vida dos organismos, sendo encontradas em uma grande diversidade de fontes tais como plantas, animais e microrganismos (BARRET et al., 2001; SAVITHA et al., 2011). A modificação dos substratos com grande seletividade e especificidade são características importantes das proteases, bem como sua atuação em reações de ativação de formas zimogênicas em enzimas líticas e o processamento e transporte de enzimas extracelulares (RAGHUNATH; BADGUIAR, 2010; RAO et al., 1998).

As enzimas proteolíticas, também conhecidas como peptidases, proteinases e proteases constituem um dos mais importantes grupos de catalizadores comerciais (RAWLINGNS et al., 2011). Representam, atualmente, mais de 60% do total de vendas de enzimas mundialmente (ADRIO; DEMAIN, 2014). Estas enzimas apresentam uma ampla aplicabilidade em processos industriais, tais como na indústria de detergentes, indústrias de couro e alimentos (GUPTA; BEG, 2002; KUMAR; TAKAGI, 1999; ORLANDELLI et al., 2012; WANDERLEY et al., 2011).

### 3.5.1 Classificação

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas no grupo 3 das hidrolases, subgrupo 4. Elas também são classificadas segundo o tipo de reação catalisada, quanto à natureza química do sítio catalítico de ação e quanto ao pH de atuação (BARRET et al., 2001; BOM et al., 2008).

Em relação à ação catalítica, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação, ou seja, as endopeptidases (E.C. 3.4.21-99) clivam ligações no interior da cadeia polipeptídica, atuando distantes das extremidades amino e carboxi terminal. Já as exopeptidases (E.C. 3.4.11-19) atuam próximas das extremidades amino e carboxi terminal, na extremidade da cadeia polipeptídica, sendo subclassificadas em aminopeptidases e carboxipeptidases (GIONGO, 2006; THYS, 2004). A Figura 3 apresenta a classificação e o mecanismo de ação das proteases.

Exopeptidases		Aminopeptidase		
	N-terminal	Dipeptidil peptidase		
		Tripeptidil peptidase		
	C-terminal	Carboxipeptidase		
		Peptidil peptidase		
		Dipeptidases		
	Omega peptidases			
Endopeptidases				

**Figura 3.** Classificação das peptidases de acordo com tipo de reação catalisada.

**Fonte:** Modificado de Barret (1994) por Bom et al. (2008).

Considerando-se a natureza química do sítio catalítico de ação, as proteases podem ser classificadas com serina (E.C. 3.4.21), cisteína (E.C. 3.4.22), aspartil (E.C. 3.4.23), metalo (E.C. 3.4.24), treonina (E.C. 3.4.25) e glutâmico-proteases. Há ainda as enzimas cujos mecanismos de ação não estão suficientemente entendidos, sendo estas classificadas em um subgrupo chamado de “mecanismo catalítico desconhecido” (E.C. 3.4.99) (BARRET et al., 2001; BOM et al., 2008; MURI, 2014).

As serina-proteases são bastante numerosas e caracterizadas pela tríade catalítica composta por serina (Ser), histidina (His) e ácido aspártico (Asp). Estas são amplamente distribuídas entre os vírus, procariotos e eucariotos, tendo importância vital para estes organismos (BARRET, 1994; MURI, 2014; RAO et al., 1998).

Em relação às cisteína-proteases, a atividade de todas elas depende da presença de cisteína (Cys), histidina (His) e ácido aspártico (Asp) no sítio ativo. Estas ocorrem em procariotos e eucariotos. Já as aspartil-proteases dependem da presença de resíduos de ácido aspártico (Asp) para a atividade catalítica (BARRET, 1995; MURI, 2014; RAO et al., 1998).

As metalo-proteases são distribuídas em todos os organismos vivos e são as enzimas que apresentam a maior diversidade de sítios catalíticos. São caracterizadas por serem ativadas na presença de um íon metálico divalente (MIYOSHI; SHINODA, 2000; RAO et al., 1998), enquanto são inibidas por agentes quelantes como ácido etileno diaminotetraacético (EDTA), ácido etilenoglicoltetraacético (EGTA) e 1,10-orto-fenantrolina (OP) (BARRET, 1995; KONDO, 2012).

As treoninas-proteases foram descritas apenas em 1995, caracterizando-se por apresentarem um resíduo de treonina (Thr) em seus sítios catalíticos. Esta classe está envolvida em muitos processos celulares fundamentais, como a divisão, crescimento, diferenciação e apoptose celular, além de modular respostas imunes e inflamatórias (MITSIADES et al., 2006; WANG; MALDONADO, 2006).

As glutâmico-proteases são as que apresentam glutamato (Glu) e glutamina (Gln) em seu sítio ativo, além de possuir o envolvimento do ácido aspártico em sua atividade. Porém, diferenciam-se das aspartil-proteases por não sofrerem inibição por pepstatina. Elas estão presentes em fungos filamentosos e bactérias (FUJINAGA et al., 2004; KONDO et al., 2010).

As proteases também podem ser classificadas quanto ao seu pH de atuação, podendo ser ácidas, neutras e alcalinas. As ácidas, que apresentam atividade na faixa de pH 2,0 a 6,0, são comumente aspartil-proteases. As proteases neutras, normalmente representadas pelas metaloproteases, cisteína-proteases e algumas serino-proteases apresentam atividade em pH na faixa de 6,0 a 8,0. Em contrapartida, as proteases que exibem atividade na faixa de pH 8,0 a 13,0 são denominadas proteases alcalinas, as quais representadas, em sua maioria, pelas serino-proteases (FELIX et al., 2004).

### *3.5.2 Fontes de obtenção de proteases*

Como mencionado anteriormente, as proteases podem ter origem animal, vegetal e

microbiana. Nestes organismos, estas enzimas desempenham funções fisiológicas essenciais, as quais são importantes na manutenção e regulação de várias vias metabólicas. Estas estão envolvidas nos processos de coagulação sanguínea, organização tecidual, inflamação, morfogênese e desenvolvimento. Ainda, pode ser citada sua participação nos processos de crescimento e migração celular, crescimento tumoral e metástase, morte celular programada, liberação de hormônios, precursores proteicos e transporte de proteínas através da membrana (CHANALIA et al., 2011; CHUTMANOP et al., 2008; RAO et al., 1998).

Quanto à fonte destas enzimas, os microrganismos são os mais utilizados, representando 40% das proteases vendidas em todo o mundo (CHANALIA et al., 2011; SANDHYA et al., 2005). Proteases microbianas despertam maior interesse devido à grande diversidade microbiológica e susceptibilidade à manipulação genética. Os microrganismos apresentam grande facilidade de cultivo e crescimento rápido, não necessitando de grandes espaços, quando comparado ao cultivo de plantas e a criação de animais (Tabela 3) (CHANALIA et al., 2011; RAO et al., 1998). Além disso, as proteases microbianas são, em geral, mais estáveis que as homólogas de plantas e animais (WISEMAN, 1991).

**Tabela 3.** Aspectos da produção enzimática de proteases pelas diferentes fontes de obtenção.

Fonte de obtenção	Tempo de obtenção	Dificuldade de cultivo	Custo	Espaço requerido	Nível de produtividade
Plantas	+++	+++	++	++	++
Animais	+++	+++	+++	+++	+
<b>Microrganismos</b>	+	+	+ / +++	+	+++

+ = valores mínimos, ++ = valores médios, +++ = valores altos.

**Fonte:** Adaptado de Rao et al. (1998) e Wiseman (1991).

Bactérias, fungos filamentosos e leveduras podem ser empregados para produção de proteases (RADHA et al., 2011). A Tabela 4 apresenta os principais microrganismos produtores de proteases, bem como os substratos empregados em sua produção. As proteases produzidas por fungos filamentosos apresentam algumas vantagens, especialmente relacionadas à facilidade de recuperação das enzimas, as quais são secretadas diretamente no meio de cultivo (ALVES et al., 2005; JISHA et al., 2013). Adicionalmente, destaca-se a grande capacidade de crescimento fúngico sobre diversas condições, como temperatura, pH, entre outras (MUTHULAKSHMI et al., 2011).

Os fungos são capazes de produzir uma variedade muito maior de proteases do que bactérias. Por exemplo, *Aspergillus oryzae* produz tanto proteases ácidas, quanto neutras e alcalinas. Proteases fúngicas são ativas em uma extensa faixa de pH (4,0 a 10,0) e exibem uma ampla especificidade por substratos, bem como mostram-se estáveis sobre condições



extremas (JISHA et al., 2013). Entretanto, apresentam uma taxa de reação mais lenta e são menos tolerantes à temperatura, quando comparadas àquelas de origem bacteriana (RAGHUNATH; BADGUIAR, 2010).

Nestes microrganismos, o papel exercido pelas proteases é o de degradar proteínas em pequenos peptídeos ou aminoácidos, a fim de suprir a célula com nutrientes quando fontes de carbono ou de nitrogênio preferíveis não estão disponíveis para a célula. A produção destas enzimas é regulada tanto por fatores ambientais, quanto nutricionais e pode ser uma resposta à indução por substratos específicos (BRAAKSMA et al., 2009).

**Tabela 4.** Principais microrganismos produtores de proteases e substratos empregados na produção.

Enzima	Substrato de cultivo	Microrganismo	Referência
Metaloprotease	Penas, queratina e lã	<i>Aspergillus oryzae</i>	Farag; Hassan, 2004
Protease ácida	Peptona de camarão	<i>Aspergillus niger</i> L1	Siala et al., 2012
Protease alcalina	Soro de queijo e água de maceração de milho	<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	Nascimento et al., 2007
Protease alcalina	Farelo de arroz	<i>Bacillus</i> sp. K-30	Naidu, Devi, 2005
Protease alcalina	Caseína e glicose	<i>Aspergillus clavatus</i>	Tremacoldi; Carmona, 2005
Protease alcalina	Pectina de maçã, soro de queijo e água de maceração de milho	<i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	Ladeira et al., 2010
Protease alcalina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	Ferracini-Santos; Sato, 2009
Protease alcalina	Maltodextrina, extrato de levedura e leite desnatado	<i>Bacillus subtilis</i>	Parimala et al., 2012
Protease alcalina	<i>Spirulina algae</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Abidi et al., 2011
Protease alcalina	Bolo de semente de mostarda	<i>Beauveria</i> sp.	Shankar et al., 2011
Protease alcalina	Amido, farelo de soja, farelo de glúten de trigo e farinha de semente de algodão	<i>Vibrio metschnikovii</i> NG155	George et al., 2014
Protease alcalina	Farinha de peixe	<i>Bacillus pumilus</i> MTCC7514	Gupta et al., 2012
Protease neutra	Pelo de porco	<i>Rhizopus oryzae</i>	Vázquez et al., 2008
Protease neutra	Farelo de trigo	<i>Aspergillus flavus</i>	Muthulakshmi et al., 2011
Protease neutra	Extrato de levedura e lactose	<i>Aspergillus funiculosus</i> G. Smith	Shumi et al., 2004
Queratinase	Cabelo Humano	<i>Trichophyton rubrum</i>	Okafor; Ngwogu, 2000
Queratinase	Cabelo humano	<i>M. gypseum</i> e <i>Chrysosporium pannicola</i>	Muhsin; Hadi, 2001
	Pena de galinha	<i>Aspergillus flavus</i>	
	Lã	<i>T. mentagrophytes</i>	
Queratinase	Pelo de cobaia	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Muhsin; Aubaid, 2000
Queratinase	Pó de pena	<i>Alternaria tenuissima</i> <i>Acremonium hyalinulum</i> <i>Curvularia brachyspora</i> <i>Beauveria bassiana</i>	Marcondes et al., 2008



Queratinase Cisteína	Pena de galinha	<i>Aspergillus</i> spp.	Kim, 2003
Queratinase	Farinha de pena	<i>Bacillus megaterium</i> RS1	Shankar et al., 2013
Queratinase	Farinha de pena	<i>Bacillus</i> sp. P45	Daroit et al., 2011
Queratinase Serina	Cabelo humano	<i>Purpureocillium lilacinum</i> LPS#876	Cavello et al., 2013
Queratinase Serina	Queratina	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Anitha; Palanivelu, 2013
Queratinase Serina	Lã de ovelha	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> <i>Bacillus subtilis</i>	Hassan et al., 2013
Serina protease	Farinha de peixe	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Hernández-Martínez et al., 2011

### 3.5.3 Importância industrial das proteases

As questões ambientais, a demanda por produtos de melhor qualidade e a necessidade de redução do consumo de energia são fatores que vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias não poluentes, mais sofisticadas e de menor custo (BOM; PEREIRA-JÚNIOR, 1999; RIFFEL et al., 2003).

As indústrias buscam formas de aumentar a produção e os lucros, para isso é necessário melhorar a eficiência dos processos empregados. Porém, concomitante a isso, é necessário priorizar os meios que possam gerar um menor impacto ambiental. A utilização de enzimas de origem microbiana nestes processos, como forma de substituir o uso de produtos químicos, pode aumentar o desempenho e a especificidade dos processos industriais. Ao mesmo tempo, pode tornar este processo favorável ao meio ambiente, reduzindo os custos de produção, aumentando a eficácia e diminuindo os custos com o tratamento de resíduos (FRIEDRICH; KERN, 2003; LI et al., 2012).

A tecnologia enzimática é de interesse das indústrias por todo o globo, em função da tendência ecológica e renovável e, pela necessidade de processos mais eficientes e economicamente viáveis. Especificamente para o Brasil, este cenário é particularmente importante, por ser um país com grande diversidade microbológica e que dispõe de grandes montantes de resíduos que podem ser empregados como substratos para a produção de enzimas. Isso contribui para a utilização de matérias primas renováveis, podendo resultar em uma maior preservação ambiental (POLITZER; BON, 2006; SANCHEZ; DEMAINE, 2011).

Em 1998, o mercado mundial de enzimas alcançou o marco de 1,6 bilhões de dólares. Já em 2009, o faturamento praticamente triplicou, correspondendo a 5,1 bilhões de dólares, apresentando um crescimento de lucro contínuo (SANCHEZ; DEMAINE, 2011). Em 2015, as projeções são de que este faturamento atinja 8,0 bilhões de dólares (LI et al., 2012). De acordo com Sanchez e Demain (2011), o aumento de estudos na área e, conseqüentemente,

o descobrimento de novas enzimas podem viabilizar seu emprego em novos processos, promovendo um maior crescimento neste setor.

O uso de enzimas como catalizadoras de processos industriais é fundamentalmente importante para obtenção de produtos com alto padrão de qualidade. No Brasil, as tecnologias limpas em consonância com as necessidades tecnológicas do mercado e da preservação ambiental aumentariam a representatividade comercial e econômica brasileira no cenário internacional, gerando benefícios econômicos, sociais e ambientais (POLITZER; BON, 2006).

Assim como para outras enzimas, a produção de proteases se torna limitada devido ao seu alto custo de produção. Estima-se que cerca de 30-40% do custo total da produção enzimática seja dispendido no substrato do meio de cultivo (JOO; CHANG, 2005; SANKARESWARAN et al., 2011). Por esta razão, a utilização de meios alternativos se torna uma opção bastante apreciável do ponto de vista comercial (AKCAN; UYA, 2011).

Devido a sua alta especificidade e eficiência catalítica degradativa, as proteases constituem uma classe particular de enzimas de imensa importância fisiológica e comercial. Estas enzimas são utilizadas como biocatalizadores para os mais diversos fins, incluindo sua aplicação na indústria de alimentos, bebidas, detergentes, couros, indústria farmacêutica e de cosmético (JISHA et al., 2013; RAGHUNATH; BADGUIAR, 2010). Na Tabela 5 estão apresentados alguns exemplos de aplicações destas enzimas de origem microbiana.

**Tabela 5.** Aplicações industriais de proteases microbianas.

<b>Principal fonte</b>	<b>Enzima</b>	<b>Aplicação industrial</b>
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria cervejeira e de panificação
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação
<i>Aspergillus melleus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo
<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos

**Fonte:** Wiseman (1991).

Diante da necessidade do uso de processos cada vez mais eficientes, as enzimas proteolíticas têm sido cada vez mais empregadas em diversos setores industriais. Estas desempenham importância fundamental para o tratamento de couro, são um dos ingredientes padrões adicionados aos detergentes, devido sua especificidade por substratos e eficiência; na

indústria de alimentos, são aplicadas em diversos produtos, laticínios, massas e na produção de hidrolisados proteicos. Na indústria farmacêutica, as proteases possuem um papel importante como suplementos enzimáticos, auxiliares digestivos, em combinações com antibióticos e no tratamento de lesões (ORLANDELLI et al., 2012; RAO et al., 1998; WANDERLEY et al., 2011).

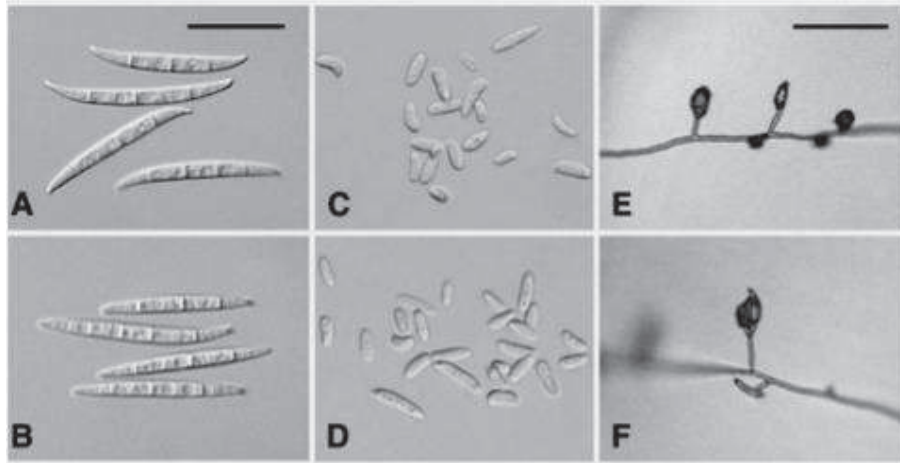
### 3.6 *Fusarium oxysporum*

O fungo *F. oxysporum* é uma espécie comumente fitopatogênica. Entretanto, há trabalhos que reportam esta espécie como endofítica, sendo também encontrada no solo, em partes aéreas e subterrâneas de plantas, em herbáceas mortas e, até mesmo conferindo proteção às plantas contra doenças causadas por outros fungos (KAVANAGH, 2005; LEMANCEAU et al., 1993). Trata-se de uma espécie com grande habilidade de adaptação, o que lhe permite crescer em diferentes substratos. É comumente encontrada em regiões tropicais e temperadas, mas também pode viver em condições climáticas extremas como o deserto e o ártico (NELSON et al., 1994).

*In vitro*, a temperatura ótima de crescimento é de 28 °C (DALMAGRO, 2007). Em relação aos critérios taxonômicos, quando cultivado em meio de cultura, conídios curvados, septados e estreitos podem ser observados. Frequentemente, pequenas projeções na base formando os chamados “foot-cells” (pés de célula) também estão presentes. Os conídios formam massas limosas, enquanto que os esporodóquios são simples, isolados e incolores (Figura 4) (ELLIS; ELLIS, 1997). Nas figuras subsequentes estão apresentadas a estrutura microscópica (Figura 5) e macroscópica (Figura 6) da linhagem de *F. oxysporum* empregada no presente trabalho.

Uma característica importante deste fungo é sua capacidade de produzir diferentes ácidos, em particular o ácido fusárico (BACON et al., 1996) e diversas enzimas, como lipases e cutinases (DALMAGRO, 2007, SANTOS, 2012).

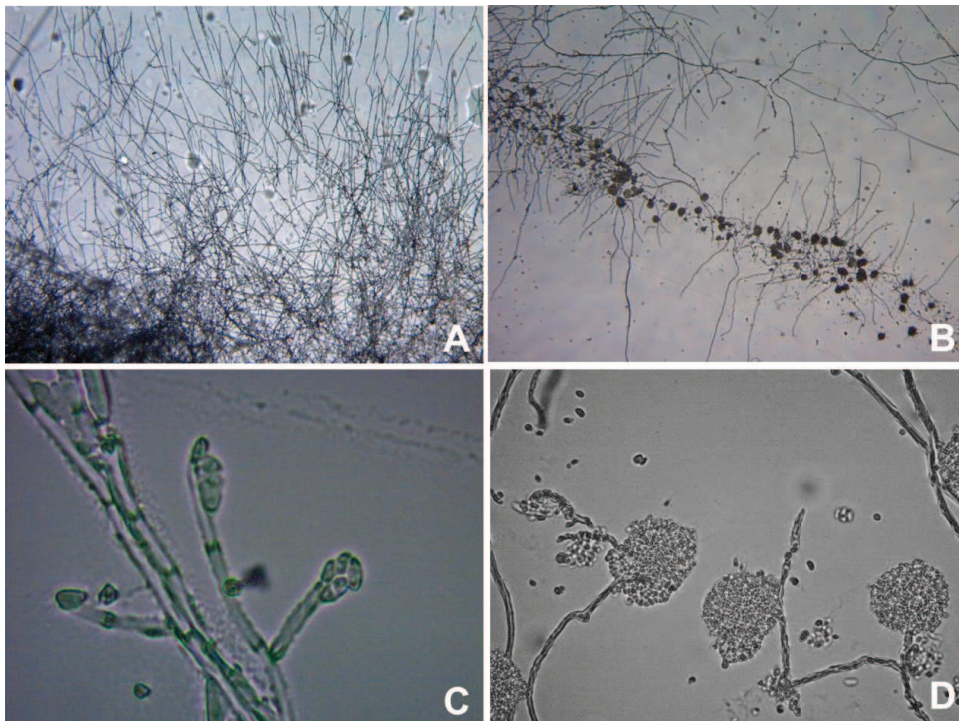
Algumas cepas de *F. oxysporum* possuem caráter patogênico e oportunista em plantas. Porém, estudos recentes reportam a identificação e o silenciamento de seus genes relacionados a fatores de patogenicidade, reduzindo em até 75% seu potencial patogênico (DENISOV et al., 2011). Outros estudos ainda demonstram a eficiência da engenharia genética em promover um aumento de até dez vezes no rendimento da produção de enzimas por algumas cepas desta espécie (SHU et al., 2010).



**Figura 4.** *F. oxysporum*. A - B: Macroconídia; C - D: Microconídia; E - F: Microconídia *in situ* em meio ágar-folha. A - D, barra de escala: 25  $\mu$ m; E-F, barra de escala: 50  $\mu$ m.

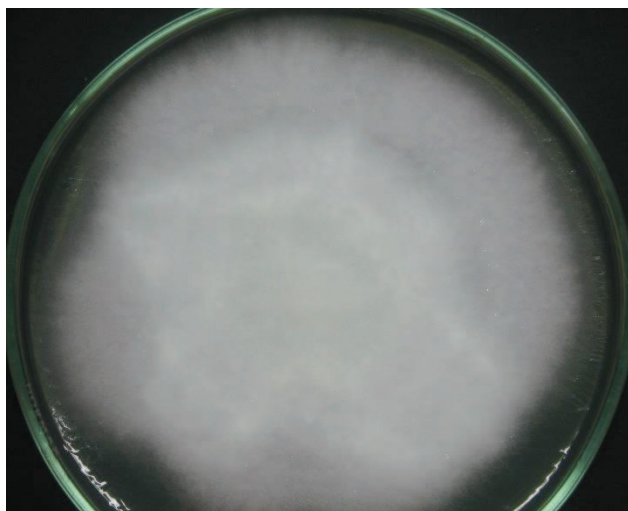
**Fonte:** Leslie; Summerell (2006).

Na literatura, estudos envolvendo a produção de proteases por *F. oxysporum* são escassos. No entanto, diversos estudos reportam a produção de outras enzimas por este fungo, tais como amilase, lipase, carboximetil-celulase, caseinase, pectinase, gelatinase, lacase e catalase, entre outras (BEVENUTO et al., 2013; BUENO et al., 2011; CORADI, 2012).



**Figura 5.** Micromorfologia de fungo *F. oxysporum*, microcultivo em meio Vogel (1956), a 28 °C, após sete dias de cultivo. A-B: Hifas, conidióforos e microconídios; C: Filiades; D: Conidióforos e aglomerações de esporos (cabeça de esporos). Resolução. A - B 4x; C 100x; D 40x.

**Fonte:** autores.



**Figura 6.** Morfologia macroscópica da cultura de *F. oxysporum*, em meio Vogel (1956), a 28 °C, após sete dias de incubação.

**Fonte:** autores.

Considerando suas características específicas de patogenicidade e, uma vez que as proteases são um dos importantes fatores de virulência apresentado pelo fungo durante o estabelecimento de uma infecção na planta, sugere-se que *F. oxysporum* seja um interessante candidato para produção de enzimas proteolíticas para uso industrial.

### 3.7 Metodologia de Superfície de Resposta

A fim de atingir a máxima produção enzimática, é necessário que seja usado um meio de cultivo perfeitamente equilibrado. Com este intuito, a utilização de métodos estatísticos para a otimização dos meios e das condições de cultivo torna-se uma ferramenta fundamental para o sucesso da produção industrial (CRUEGER; CRUEGER, 1993; MONTGOMERY, 1999).

Para que seja realizada a otimização das condições de cultivo pela metodologia clássica, há o emprego de uma variável independente (pH, temperatura, substrato, etc.) por vez e a fixação das demais variáveis - para que seja analisado uma por vez, sem a influência de nenhum outro fator. Este processo é extremamente demorado e dispendioso, principalmente quando existe um grande número de variáveis. Ainda, conclusões falsas podem ser geradas (ADINARAYANA et al., 2003).

A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste no emprego de técnicas matemáticas e estatísticas para desenhos experimentais com o objetivo de otimizar a resposta



esperada (KOHLI; SINGH, 2011). Originalmente, a MSR foi proposta por Box e Wilson (1951), com o intuito de responder problemas de determinação de condições ótimas em investigações químicas. Atualmente, esta metodologia está sendo amplamente aplicada com sucesso em diversas áreas da Biotecnologia (LADEIRA et al., 2010; PARIMALA et al., 2012; SHANKAR et al., 2013; SIALA et al., 2012).

A MSR visa a determinação de modelos empíricos para estabelecer relações estatísticas entre as variáveis empregadas em um determinado sistema industrial. A grande vantagem do emprego da MSR é a diminuição do número de amostras para realização de um determinado experimento, resultando na redução do tempo despendido nos experimentos, assim como a redução dos custos de produção (JIMÉNEZ-CONTRERAS et al., 2008; MANIKANDAN et al., 2011).

O Delineamento Central Composto (DCC) consiste em um grupo de procedimentos, estatísticos e matemáticos de segunda ordem. Existem diversos delineamentos para aplicação do modelo de segunda ordem, mas o DCC é o mais conhecido deles e pode ser usado no estudo das inter-relações entre uma ou mais respostas (variáveis dependentes) com inúmeros fatores (variáveis independentes). Compõe-se por três partes: cúbica fatorial (de um delineamento  $2^q$  e um delineamento  $2^{q-k}$  fatorial fracionário), axial( $\alpha$ ) e central (BRADLEY, 2007).

Em relação à produção de proteases, a MSR vem sendo amplamente utilizada como uma técnica de otimização, considerando que a produção enzimática é consideravelmente influenciada por diversos fatores como temperatura, pH, tempo de incubação, tipo de substrato, suplementação do meio com fontes indutoras, presença de íons metálicos e outros componentes do meio de cultivo (DAROIT et al., 2011; JOHNVESLY; NAIK, 2001; KOLE et al., 1998; PARIMALA et al., 2012; SHANKAR et al., 2013; VARELA et al., 1996).

## 4. CAPÍTULO I

### Bioprospecção de fungos produtores de proteases

#### Resumo

A seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas constitui uma etapa importante nos processos biotecnológicos, nos quais estas enzimas deverão ser empregadas. Deste modo, há considerável interesse na biodiversidade e em isolar microrganismos com potencial para a produção enzimática. Dentre as enzimas comerciais, as proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos, representando cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. O presente trabalho teve por objetivo avaliar linhagens fúngicas distintas isoladas a partir de diferentes ambientes quanto à capacidade de produção de proteases. Objetivou-se, ainda, avaliar o uso do pelo de cachorro como substrato alternativo para a produção destas enzimas. No total, 73 linhagens fúngicas foram avaliadas, sendo 38 linhagens de fungos filamentosos e 35 leveduriformes. As dez melhores linhagens produtoras de proteases em presença de caseína foram testadas quando ao potencial de produção dessas enzimas, empregando-se o pelo de cachorro preto como substrato. Destacam-se, aqui, os níveis de produção apresentados pela linhagem D06, isolada a partir de água residuária de frigorífico e pela linhagem BV (*Fusarium oxysporum*), isolada a partir de óleo contaminado. Ainda, esta última se destacou pelos níveis de proteases alcalinas produzidas, quando as colorações de pelo branca e preta foram avaliadas. Diante de sua ampla disponibilidade e baixo custo, o pelo de cachorro demonstrou ser um substrato alternativo promissor para produção de proteases pelo fungo *F. oxysporum*.

**Palavras-chave:** fungos filamentosos, leveduras, isolamento, pelo de cachorro, *Fusarium oxysporum*.

## 4.1 Introdução

A tecnologia enzimática é empregada em diversos setores industriais. As enzimas são empregadas em substituição a produtos químicos e processos mecânicos, devido sua alta especificidade, baixo custo e segurança mas, principalmente, por ser um produto biodegradável e que não causa danos ao meio ambiente (LI et al., 2013; TAVANO, 2013).

Enzimas de origem microbiana são preferíveis as de origem animal e vegetal, devido a grande variedade de atividades catalíticas, rápido tempo de obtenção, alto rendimento, maior estabilidade e baixo custo. De um modo geral, os microrganismos são produtores eficientes de enzimas. Na natureza, os fungos estão envolvidos nos processos de degradação de uma grande variedade de materiais complexos, sendo esta habilidade atribuída a extensa diversidade de enzimas produzidas (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; SOHAIL et al., 2009).

Apesar do grande número de microrganismos atualmente empregados nos processos industriais, a busca por novas linhagens que produzam de forma mais eficiente essas enzimas se faz necessária (JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; LI et al., 2013). Diversos trabalhos têm sido relatados na literatura, envolvendo a bioprospecção de microrganismos para a produção de proteases. Estes microrganismos têm sido isolados a partir de diversos ambientes, incluindo o solo, plantas, águas residuais, resíduos industriais entre outros (ABIDI et al., 2011; GUPTA et al., 2012; HASSAN et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; SHANKAR et al., 2011).

As enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de catalizadores comerciais (RAWLINGNS et al., 2011). Representam, atualmente, mais de 60% do total de vendas de enzimas mundialmente (ADRIO; DEMAIN, 2014). Estas enzimas apresentam uma ampla aplicabilidade em processos industriais, tais como na indústria de detergentes, indústrias de couro e alimentos (ORLANDELLI et al., 2012; WANDERLEY et al., 2011).

O presente trabalho teve por objetivo realizar a bioprospecção de fungos filamentosos e leveduras capazes de produzir proteases, isolados a partir de diversos ambientes. Objetivou-se, ainda, avaliar a capacidade dos isolados selecionados de produzir proteases empregando-se o pelo de cachorro como substrato alternativo. Considerou-se a hipótese inicial de que fungos isolados de ambientes ricos em proteína são os que apresentam maior capacidade proteolítica.

## 4.2 Material e Métodos



#### 4.2.1 Microrganismos

Um grande número de linhagens de fungos (73) isoladas a partir de ambientes distintos foram avaliadas quanto ao seu potencial de produção de proteases neutras (Tabela 1). As linhagens foram isoladas no Laboratório de Microbiologia Aplicada da UNICENTRO e mantidas por meio de repiques periódicos.

#### 4.2.2 Determinação da atividade proteásica

A atividade de protease foi determinada por meio da incubação de 3 mL de caseína a 2% (m/v) em tampão McIlvaine pH 7,0 e de 3 mL do filtrado enzimático apropriadamente diluído no mesmo tampão, por 20 minutos, a 37 °C. A reação foi paralisada pela adição de ácido tricloroacético a 10% (m/v). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4.000 g por 20 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada a 280 nm contra branco apropriado. Uma unidade enzimática (U) correspondeu ao aumento de 0,1 na absorbância, por uma hora de reação, por mL de amostra (TREMACOLD; CARMONA, 2005).

#### 4.2.3 Condições de cultivo

As linhagens fúngicas foram cultivadas em meio sólido de Vogel (VOGEL, 1956), contendo 1,5% (m/v) de glicose e 1,5% (m/v) ágar, a 28 °C, por sete dias. Após este período, os esporos foram suspensos em água destilada esterilizada, sendo a suspensão filtrada em lâ de vidro estéril para a remoção dos fragmentos de hifas e suas concentrações ajustadas  $1,0 \times 10^7$  esporos mL<sup>-1</sup>. Um mililitro desta suspensão foi inoculado em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio líquido de Vogel, em pH 6,5 a 28 °C, suplementados com 1% de fonte de carbono. Após o crescimento em meio líquido por 7 dias, as culturas foram filtradas a vácuo em funil de Büchner. O extrato bruto obtido foi utilizado como fonte de enzimas extracelulares.

#### 4.2.4 Seleção inicial de levedura

A produção de proteases por leveduras foi avaliada pelo teste indutivo em placas de Petri, empregando-se o meio sólido ágar-gelatina, composto por gelatina em pó incolor 5g/L; ágar 10 g/L, tampão McIlvaine pH 7,0 50% (m/v) e água destilada. Os meios foram autoclavados a 121 °C, por 15 min. Após inoculação das leveduras, as culturas foram incubadas a 28 °C. Após o crescimento microbiano no intervalo de 48-72 horas, as placas foram coradas com solução contendo Comassie Blue 0,2% (m/v), metanol 500 mL/L, ácido

acético 100 mL/L e água destilada, a temperatura ambiente. Cerca de 10 mL da solução corante foram vertidos em cada placa, deixando-se agir por 15 min. Após, as placas foram lavadas delicadamente com água destilada. Para o processo de descoloração uma solução reveladora foi utilizada, constituída por metanol (330 mL/L), ácido acético (100 mL/L) e água destilada. A solução foi vertida nas placas, agindo até o momento em que os halos de degradação se tornassem visíveis. Após este processo, foi possível observar o halo de crescimento das colônias e o índice enzimático pôde ser calculado. Este teste foi realizado com o intuito de determinar semi-quantitativamente a produção das proteases. O valor do índice enzimático (IE) foi obtido pela divisão da medida do halo de degradação pela medida do halo de crescimento da colônia.

Para critério de seleção, a linhagem foi considerada boa produtora de enzimas extracelulares em meio sólido quando apresentou o IE maior ou igual a 2,0 (LEALEM; GASHE, 1994).

#### 4.2.5 Seleção inicial de fungos filamentosos

As linhagens de fungos filamentosos foram cultivadas em meio submerso contendo meio líquido de Vogel (VOGEL, 1956), em pH 6,5, suplementados com 1% (m/v) de caseína, sendo mantidas a 28 °C por sete dias. Após o cultivo, a determinação da atividade proteolítica foi conduzida conforme descrição apresentada anteriormente (Item 4.2.2).

#### 4.2.6 Seleção dos melhores fungos produtores de proteases em pelo de cachorro

As linhagens melhores produtoras de proteases foram incubadas em meio submerso contendo 1% (m/v) de pelo de cachorro (na coloração preta) como única fonte de carbono, a 28 °C, por sete dias. Após este período, a determinação de proteases neutras foi realizada. As duas melhores linhagens produtoras foram incubadas por um período de 7 dias, em meio submerso contendo 1% de pelo de cachorro em diferentes colorações. Posteriormente, as atividades proteásicas neutra e alcalina foram determinadas em pH 7,0 e pH 9,0, respectivamente.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Seleção inicial de fungos leveduriformes produtores de proteases

Inicialmente, 35 linhagens de leveduras foram avaliadas quanto ao potencial de produção de proteases. Placas de Petri contendo meio ágar-gelatina serviram como substrato

para o crescimento destas. Após acompanhamento diário das colônias, o índice enzimático foi calculado (Tabela 2). Nenhuma linhagem leveduriforme apresentou índice enzimático significativo e dentre estas, 14 linhagens (40%) não apresentaram nenhuma capacidade proteolítica, sendo esta revelada pela ausência de halo de degradação. O maior índice enzimático foi apresentado pelo isolado BVL4, correspondendo a 1,33.

Similarmente ao presente estudo, El-Diasty e Salem (2007) avaliaram 64 leveduras isoladas de leite quanto ao seu potencial de produção de proteases. Em 31 linhagens (48,4%), a atividade proteolítica também não foi evidenciada. Em outro estudo realizado por Pereira (2012), no qual 40 isolados fúngicos foram testados *in plate* quanto a produção de diferentes enzimas, apenas 13 produziram proteases, sendo que apenas um isolado apresentou IE = 2,0, sendo considerado bom produtor desta enzima.

#### 4.3.2 Seleção inicial de fungos filamentosos produtores de proteases

Em relação aos fungos filamentosos, 38 isolados foram avaliados quanto ao seu potencial de produção de proteases neutras, em cultivo submerso, empregando-se a caseína como substrato (Tabela 3). Ao avaliar as diferentes linhagens fúngicas, 23 destas não apresentaram nenhuma atividade proteolítica. Os isolados D03, BV, BVC, ES05, T1, MIM01, F1, S10, M4, J40 apresentaram níveis de produção similares, em torno de  $1 \text{ U mL}^{-1}$ , enquanto que o fungo D6 apresentou os níveis mais elevados da enzima de interesse ( $16,16 \pm 0,125 \text{ U mL}^{-1}$ ).

Ouros trabalhos na literatura reportam a produção de proteases microbianas empregando-se a caseína como substrato (NAIDU; DEVI, 2005; TREMACOLDI; CARMONA, 2005). Por ser um substrato puro, a utilização da caseína inviabiliza economicamente a produção destas enzimas por acarretar aumentos em seus custos de produção. Por esta razão, a capacidade proteolítica dos fungos previamente selecionados foi avaliada, utilizando-se o pelo de cachorro como única fonte de carbono, um resíduo de baixo custo, amplamente disponível e até o presente momento sem nenhum valor agregado.

#### 4.3.3 Seleção das linhagens melhores produtoras de proteases empregando-se pelo de cachorro como substrato

Os fungos filamentosos que se destacaram quanto à produção de proteases quando cultivados em presença de caseína foram avaliados quanto à produção de proteases

empregando-se o pelo de cachorro na coloração preta, como única fonte de carbono. As leveduras não foram cultivadas em pelo de cachorro, por nenhuma linhagem ter apresentado índice enzimático satisfatório. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. As linhagens fúngicas que apresentaram melhor produção de enzimas proteolíticas foram as linhagens D03 e BV, correspondendo a uma produção de 8,0 e 7,38 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Posteriormente, a produção de proteases neutras (pH 7,0) e alcalinas (pH 9,0) em pelo de cachorro pelas linhagens melhores produtoras foi avaliada (Tabela 5). Nesse sentido, pelos de colorações branca e preta foram avaliados. Pode ser observado uma maior produção de proteases alcalinas pela linhagem BV (posteriormente identificada como sendo o fungo *F. oxysporum*), correspondente a 10,13 U mL<sup>-1</sup>.

Até o presente momento, nenhum trabalho na literatura reporta a produção de enzimas em geral empregando-se o pelo de cachorro. No entanto, pelo de porco, cabelo humano, lã de carneiro têm sido descritos como substratos alternativos para a produção de proteases (CAVELLO et al., 2013; HASSAN et al., 2013; MUHSIN; HADI, 2001; OKAFOR; NGWOGU, 2000; VÁZQUEZ et al., 2008).

Com base nos resultados obtidos e diante da extensa aplicabilidade industrial das proteases alcalinas, os estudos subsequentes foram realizados envolvendo a produção de proteases alcalinas pelo fungo BV, empregando-se os pelos de coloração branca e preta como substratos.

#### 4.4 Considerações finais

Dentre 73 linhagens de fungos avaliadas, as linhagens de fungos filamentosos D06 e BV (*F. oxysporum*), isolados de água residuária de frigorífico e óleo contaminado, respectivamente, foram as que apresentaram os melhores níveis de produção de proteases neutras, ao se empregar o pelo de cachorro preto como constituinte único do meio de cultura. Ainda, bons níveis de proteases alcalinas foram produzidos pela linhagem *F. oxysporum*, em presença de pelo de cachorro nas colorações branca e preta. Este estudo reporta, pela primeira vez, o pelo de cachorro como um substrato atrativo e de baixo custo para ser empregado nos processos de produção de proteases microbianas.

#### 4.5 Referências

ABIDI, F.; CHOBERT, J.M.; HAERTLE, T.; MARZOUKI, M.N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.

ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.

CAVELLO, I. C.; HOURS, R. A. ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 972-978, 2013.

EL-DIASTY, E. M.; SALEM, R.M. Incidence of lipolytic and proteolytic fungi in some milk products and their public health significance. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 3, n. 12, p. 1684-1688, 2007.

GUPTA, R. K.; PRASAD, D.; SATHESH. J.; NAIDU, R. B.; KAMINI, N. R.; PALANIVEL, S.; GOWTHAMAN, M. K. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 1230-1236, 2012.

HASSAN, M. A.; HAROUN, B. M.; AMARA, A. A.; SEROUR, E. A. production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. **BioMed Research International**, v. 2013, 14 pages, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

LEALEM, F.; GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology**, Danvers, v. 77, n. 3, p. 348-352, 1994.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

MUHSIN, T. M.; HADI, R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from sewage sludge. **Mycrobiologia**, v. 154, p.185-189, 2001.

NAIDU, K. S. B.; DEVI, K. L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal of Biotechnonology**, v. 4, n. 7, p. 724-726, 2005.

OKAFOR, J. I.; NGWOGU, A. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. **Journal of Communicable Diseases**, v. 32, n. 4, p. 300-305, 2000.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PEREIRA, V. M. **Avaliação do potencial enzimático de fungos filamentosos e otimização**

da produção de celulases por *Aspergillus sulphureus* (Fresen.) Wehmer. 2012, 112F. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, LAVRAS, 2012.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. T.; BATEMAN, A. Asparagine peptidase lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **Jornal of Biology and Chemistry**, v. 286, p. 38321-38328, 2011.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 579-585. 2011.

SOHAIL, M. et al. Distribution of hydrolytic enzymes among native fungi: *Aspergillus* the pre-dominant genus of hydrolase producer. **Pakistan Journal Botany**, Lahore, v. 41, n. 5, p. 2567-2582, 2009.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 169–172. 2005.

VÁZQUEZ, I. R., AGUILERA, A. F.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; AGUILAR, C. N. Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. **Información Tecnológica**, v. 19, n. 2, p. 33-40, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for (medium N). **Microbial genetics bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

**Tabela 1.** Linhagens testadas de fungos filamentosos e leveduriformes isolados a partir de diferentes ambientes.

Origem de isolamento	Linhagens	
	Leveduriformes	Filamentosas
Águas residuais Frigorífico	JC1, JC4, JC5, M2, M4, M5, M6, M7, N2, N3, N5, N9, N10, N11, S2, S5, S6, S7, S8, S9, T2, T3, T5	D02, D03, D04, D06, N1, N4, N5, N8, T1, T4, T6, T3C, M8, M10, S3, S10, S12
Endofíticos	-	ES01, ES02, ES03, ES04, ES05, MIM01, MIM02
Solo de mata Atlântica	-	J3, J4, J11, J26, J36, J38, J40, J54,
Solo contaminado com cromo	-	F1, D2, D10, M4
Óleo contaminado	L1, L3, BVL1, BVL2, BVL3, BVL4	BV, BVC
Ovas de peixe	LP1, LP2, LP3, LP4, LP5, LP6	-

**Tabela 2.** Seleção inicial de leveduras produtoras de proteases, isoladas a partir de diferentes ambientes.

<b>Linhagem</b>	<b>Índice Enzimático</b>	<b>Linhagem</b>	<b>Índice Enzimático</b>
<b>BVL1</b>	ND	<b>M6</b>	1,10
<b>BVL2</b>	ND	<b>M7</b>	1,06
<b>BVL3</b>	1,20	<b>N10</b>	1,02
<b>BVL4</b>	1,33	<b>N11</b>	1,07
<b>JC1</b>	ND	<b>N2</b>	1,05
<b>JC4</b>	ND	<b>N3</b>	ND
<b>JC5</b>	ND	<b>N5</b>	1,09
<b>L1</b>	1,16	<b>N9</b>	ND
<b>L3</b>	1,17	<b>S2</b>	ND
<b>LP1</b>	ND	<b>S5</b>	1,05
<b>LP2</b>	1,04	<b>S6</b>	1,04
<b>LP3</b>	1,16	<b>S7</b>	1,06
<b>LP4</b>	ND	<b>S8</b>	ND
<b>LP5</b>	1,04	<b>S9</b>	1,04
<b>LP6</b>	1,03	<b>T2</b>	ND
<b>M2</b>	1,02	<b>T3</b>	ND
<b>M4</b>	1,03	<b>T5</b>	1,04
<b>M5</b>	ND		

ND = atividade enzimática não detectada



**Tabela 3.** Seleção inicial de fungos filamentosos produtores de proteases neutras.

<b>Linhagem fúngica</b>	<b>Atividade Proteásica (U mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Teor Protéico intracelular (mg de proteína)</b>	<b>Linhagem fúngica</b>	<b>Atividade Proteásica (U mL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Teor Protéico intracelular (mg de proteína)</b>
<b>BV</b>	1,047±0,040	12,38±0,198	<b>J38</b>	ND	27,82±2,342
<b>BVC</b>	1,057±0,012	27,00±1,013	<b>J40</b>	0,677±0,015	23,83±2,195
<b>D2</b>	0,430±0,017	56,04±0,819	<b>J54</b>	ND	0,00±0,00
<b>D02</b>	ND	46,35±0,751	<b>M4</b>	0,767±0,012	0,00±0,00
<b>D03</b>	1,160±0,044	0,00±0,00	<b>M8</b>	ND	1,04±0,109
<b>D04</b>	ND	0,00±0,00	<b>M10</b>	ND	15,11±1,248
<b>D6</b>	16,16±0,125	56,49±4,494	<b>MIM01</b>	0,947±0,038	26,31±1,586
<b>D10</b>	0,530±0,010	22,82±1,877	<b>MIM02</b>	ND	0,00±0,00
<b>ES01</b>	ND	5,49±0,532	<b>N1</b>	0,597±0,006	0,00±0,00
<b>ES02</b>	ND	0,00±0,00	<b>N4</b>	ND	16,80±1,347
<b>ES03</b>	ND	31,71±0,970	<b>N5</b>	ND	63,55±3,908
<b>ES04</b>	0,383±0,006	0,00±0,00	<b>N8</b>	ND	0,00±0,00
<b>ES05</b>	0,620±0,010	0,00±0,00	<b>S3</b>	ND	2,53±0,127
<b>F1</b>	1,017±0,031	30,29±1,096	<b>S10</b>	1,083±0,021	0,00±0,00
<b>J3</b>	ND	0,00±0,00	<b>S12</b>	ND	0,00±0,00
<b>J4</b>	ND	0,00±0,00	<b>T1</b>	0,680±0,010	50,40±3,012
<b>J11</b>	ND	0,00±0,00	<b>T3C</b>	ND	7,75±0,687
<b>J26</b>	ND	0,00±0,00	<b>T4</b>	ND	0,00±0,00
<b>J36</b>	ND	0,00±0,00	<b>T6</b>	ND	0,00±0,00

ND = atividade enzimática não detectada

**Tabela 4.** Produção de proteases neutras por fungos filamentosos, empregando-se 1% (m/v) de pelo de cachorro na coloração preta como substrato.

<b>Linhagem fúngicas</b>	<b>Atividade Proteásica (U mL<sup>-1</sup>)</b>
D03	8,00 ± 0,09
BV	7,38 ± 0,18
BVC	1,87 ± 0,08
D6	1,62 ± 0,08
T1	1,53 ± 0,07
MIM01	0,08 ± 0,02
F1	0,00 ± 0,00
S10	0,00 ± 0,00
M4	0,00 ± 0,00
J40	0,00 ± 0,00

**Tabela 5.** Avaliação da atividade proteásica neutra e alcalina dos fungos BV e D03, empregando-se 1% (m/v) de pelo de cachorro nas colorações preta e branca.

Fonte de Carbono	Fungo BV		Fungo D03	
	pH 7,0 (U mL <sup>-1</sup> )	pH 9,0 (U mL <sup>-1</sup> )	pH 7,0 (U mL <sup>-1</sup> )	pH 9,0 (U mL <sup>-1</sup> )
Pelo Preto	7,38 ± 0,18	10,13 ± 0,15	8,00 ± 0,09	5,03 ± 0,06
Pelo Branco	2,64 ± 0,10	3,49 ± 0,15	2,94 ± 0,10	1,80 ± 0,04

## 5. CAPÍTULO II

### **Production of alkaline protease by *Fusarium oxysporum* using dog hair: a novel alternative substrate**

Prolo, T.<sup>1</sup>, Izidoro, S.C.<sup>1</sup>; Lima, V.A.<sup>2</sup>, Knob, A.<sup>1\*</sup>.

#### **Abstract**

Alkaline proteases have an extensive industrial application, such as in leather, detergent, pharmaceutical, cosmetics and food industries. Recently, studies has focused on exploration of new and inexpensive carbon sources to their production. This work evaluates the feasibility of using white dog hair as a substrate for protease production by a *Fusarium oxysporum* strain. The effects of pH of medium, cultivation time and dog hair concentration on alkaline protease production were evaluated using a Central Composite Rotational Design (CCRD) combined with Response Surface Methodology (RSM). Maximum protease production of 51.84 U mL<sup>-1</sup> was observed in the medium of pH 6.0, containing 5.0% dog hair residue, after 6.5 days of cultivation. Thus, optimized cultivation conditions increased protease activity 14.85-fold, compared to the initial conditions. The enzymes show optimal activity at 65 °C and pH 8.0 and were stable at 50 °C and in pH range of 7.0-10.5. An increasing in protease activity was observed in the presence of the substances methanol, isopropanol, ethanol, tween 20, tween 80, DMSO and Triton X-100, revealing its potential application in detergent formulation. Additionally, the results obtained in the present investigation demonstrate the potential application of white dog hair for protease production and open new perspectives for its utilization in other biotechnological process.

**Key-words:** proteolytic enzymes, central composite design, filamentous fungi, response surface methodology

## 5.1 Introduction

Proteases are enzymes that can hydrolyze peptide bonds in other proteins in a specific way. They represent one of the three largest groups of industrial enzymes, constituting over 60% of the global market for enzymes (ADRIO; DEMAIN, 2014). These enzymes are extensively applied in several sectors of industry and biotechnology, including their use in leather, detergent, pharmaceutical, cosmetics and food industries (LI et al., 2013; TAVANO, 2013).

Sources of proteases include plants, animals, and microorganisms. However, the production of proteases from plant and animal sources is limited due to climatic reasons and ethical issues, respectively (JISHA et al., 2013). Several commercially available proteases are currently derived from *Bacillus* strains (SIALA et al., 2012). Nevertheless, the potential use of fungal proteases has been established in recent years. In fact, fungal enzymes are commonly used in industries due to various technical reasons, such as the feasibility of recovering high concentration of enzymes in the culture medium. In addition, fungal proteases offer a distinct benefit over bacterial enzymes in relation to easiness of downstream processing (LAXMAN et al., 2005, SIALA et al., 2012).

Microorganisms that show the ability of degrade insoluble keratin are designed as keratinolytic. They usually have high plasticity for growing in different ecological and environmental conditions, exhibiting a variety of keratinase degradation ability. The synthesis of extracellular proteases enables their assimilation of nutrients from keratin (SHARMA; CHOUDHARY, 2014). Keratinolytic proteases have broad substrate specificity. Thus, they are able to hydrolyze soluble proteins, such as casein, gelatin, and bovine serum albumin. Additionally, they can hydrolyze the insoluble proteins, including silk, feather and wool (DAROIT; BRANDELLI, 2014; EVANS et al., 2000).

The successful strategy to produce microbial enzymes can be achieved through microorganism selection, since there are a variety of enzymes produced by fungi. Other strategies include screenings using cheaper and alternative substrates and the improvement of fermentation process conditions (KNOB et al., 2014). According to Poddar et al. (2012), the reach of optimized fermentation conditions is of primary and great importance for the development of enzyme production process, due to their impact upon its economy and feasibility. In addition, Central Composite Design (CCRD) and Response Surface Methodology (RSM) are useful and robust techniques for process optimization, effectively employed to establish the influence of multiple factors on the microbial proteases production

(BACH et al., 2012; DODDAPANENI et al., 2007; FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010).

A variety of specialized pet services has emerged in recent years, largely the result of a “pet parenting” attitude among owners. Only in Brazil, it is estimate that exists an average of 106 million of pets. The pet shops are responsible for generate a high demand for disposal wastes that could be potentially infectious, including dog hair. When it was disposed improperly, dog hair could offer risks to other organisms. However, the appropriate disposal of this residue involves considerable costs (APHA, 2014; CFMV, 2013; EUROPEAN UNION, 2002). At the date, to the best of our knowledge, no report in the literature concerning dog hair use in biotechnological processes exists.

Since dog hair is a residue that dispend costs to their appropriate disposal and still cause environmental impacts so, the objective of this study was evaluate the feasibility of using white dog hair as a substrate for protease production by this fungal strain. Statistical approaches were adopted to determine the optimal values of the significant variables and investigate the combined effects of variables on alkaline protease production. In addition, the enzymes produced were biochemically characterized.

## 5.2 Material and Methods

### 5.2.1 Dog hair residue

Dog hair was obtained from locally pet shops. The residue was collected from distinct animals and separated by color. For this purpose, only white hair was used. The residue was prepared by exhaustive washing with distilled water. The dog hair was then dried at 40 °C for 48-72 hours.

### 5.2.2 Microorganism and culture conditions

*F. oxysporum* was isolated from contaminated oil (diesel). The fungus was grown on Vogel’s solid medium (VOGEL, 1956) containing 1.5% (w/v) glucose and 1.5% (w/v) agar, at 28 °C, for 7 days for conidia production. Submerged fermentation was carried out in 125 mL flasks containing 25 mL of Vogel’s liquid medium (VOGEL, 1956), pH 6.5 and inoculated with 1.0 mL spore suspension ( $1.0 \times 10^7$  spores/mL). The cultures were incubated at different conditions as indicated subsequently. Following incubation, they were vacuum filtered and the filtrate was assayed for protease activity.

### 5.2.3 Enzymatic assay

The alkaline proteolytic activity was determined according to Tremacoldi and Carmona (2005), with minor modifications. For this, 3 mL of appropriately diluted enzyme sample was incubated with 0.05 M tris-HCl buffer pH 9.0 and 3 mL of casein at 2% (w/v) in the same buffer, for 5 min at 37 °C. The reaction was stopped by 2 mL of 10% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) addition, followed by centrifugation at 3900 x g for 20 min. The proteolytic activity was determined by the absorbance reading of the supernatant at 280 nm, against an appropriate blank. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing an increase of 0.1 in the absorbance at 280 nm, per mL of sample, during 1 h. The enzyme assay was performed in triplicated and results are represented as mean values.

### 5.2.4 Experimental design for alkaline protease production

Response surface methodology (RSM) was employed in this investigation to optimize the submerged fermentation process for enhancing alkaline protease production by *F. oxysporum*. A factorial central composite rotary design (CCRD) was used to establish the optimal points of the three factors: substrate concentration, cultivation time and pH of medium. For this purpose, an experiment with 18 runs, including  $2^3$  factorial experiments with three factors and five levels including six axial points and three central points were conducted for fitting a second order model.

The relationships between responses and variables were determined with the statistical package (STATISTICA® 6.0). Table 1 presents the experimental designs employed for alkaline protease production using dog hair as substrate. This methodology specifically allows for the modeling of a second order equation that describes the process protease production was analyzed by linear multiple regression analysis through the least squares method to fit the following equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \varepsilon$$

where Y is the measured response;  $\beta_0$  is the intercept term;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  are linear coefficients,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  and  $\beta_{33}$  are quadratic coefficients;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  and  $\beta_{23}$  are interaction coefficients and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  represent the independent variables: substrate concentration [S], cultivation time (T) and pH of medium (pH), respectively. The term  $\varepsilon$  represents the experimental error.

The combination of different optimized variables, which yielded the maximum response, was experimentally validated by culturing *F. oxysporum* under optimized production

conditions, in triplicate. For this purpose, hair from different dogs were employed in process optimization.

#### 5.2.5 Scanning electron microscopy (SEM) images

Samples of hair were subjected to SEM studies to determine the dog hair degradation by *F. oxysporum*, using scanning electron microscopy VEGA 3, TESCAN, with SE detector, tungsten heated cathode at 20KV of accelerate voltage and 10mm field of view. Samples treated and untreated were freeze-dried and metallized by depositing a layer of gold through the sputtering technique for the sample become conductive.

#### 5.2.6 Enzyme characterization

##### 5.2.6.1 Optimum temperature and pH

The optimum temperature was determined by measuring the activity at temperatures of 25 °C to 85 °C in intervals of 5 °C in Tris-HCl buffer pH 9.0. Optimum pH was determined using casein at 2% (w/v) as substrate, in McIlvaine (pH 7.0 - 7.5), Tris-HCl (pH 8.0 - 9.0), and glycine-NaOH (pH 9.5 – 10.5) buffers, at intervals of 0.5 units.

##### 5.2.6.2 Protease thermostability and pH stability

The thermal stability was measured by incubating the crude filtrate for different periods, at temperatures of 50, 55 and 60 °C. Following incubation, the enzyme solution was frozen and the remaining activity was determined. For pH stability assays, the culture filtrate was diluted (1:2 v/v) in McIlvaine (pH 7.0 - 7.5), Tris-HCl (pH 8.0 - 9.0), and glycine-NaOH (pH 9.5 – 10.5) buffers, at intervals of 0.5 units and incubated at 4 °C. After 24 hours, the residual alkaline protease activity was assayed under optimal conditions.

##### 5.2.6.3 Effect of metallic ions and other compounds

The effect of metallic ions, disodium ethylenediaminetetracetate (EDTA) and  $\beta$ -mercaptoethanol was evaluate at 2 mM and 10 mM concentrations. In addition, the effect of methanol, ethanol, isopropanol, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 and dimethylsulfoxide (DMSO) on protease activity was determined at concentrations of 0.5% and 1%. The residual activities were measured in relation to the control by performing the enzyme activity assay under optimal conditions.



## 5.3 Results and Discussion

### 5.3.1 Process optimization of alkaline protease production by *F. oxysporum* using RSM based on CCRD

Among 73 fungal strains isolated from distinct habitats, a strain of *Fusarium oxysporum* attracted attention for producing high levels of proteases in the presence of dog hair. Initially, the dog hair colors black and white were evaluated. Previous results showed that the protease production is influenced by distinct factors, according to the dog hair color (data not shown). The levels of alkaline protease production obtained with white dog hair corresponded to 3.49 U mL<sup>-1</sup> (data not shown). Thus, the following studies were conducted using only this dog hair color.

Some experiments were also previously done in order to determine the parameters that affect protease production by *F. oxysporum*, using the experimental knowledge of one variable at a time approach for taking the range of each variable. Dog hair concentration, pH of medium and cultivation time were established as the most influential parameters in this process (data not shown). The design matrix and the corresponding experimental data to determine the effects of three independent variables on alkaline protease production are shown in Table 1.

Table 2 presents the analysis of variance (ANOVA) for alkaline protease production. The ANOVA analysis indicated that the model can explain 90.63% variation response. F-values implied that the models are significant ( $p < 0.05$ ). Thus, the high coefficient of determination ( $R^2 = 0.9063$ ) obtained for enzyme production suggests that the models are accurate for explaining the protease production.

RSM is an efficient and important technique to developing new microbial processes. This approach has been used as a tool for optimization enzyme production, including proteases. It was one of the most important criteria for establishing the optimum conditions for a multivariable system (SHANKAR et al., 2013). A *Bacillus megaterium* strain exhibited high protease production levels (142.9 U mL<sup>-1</sup>) when the second-order quadric model with one-step RSM for three factors were applied (SHANKAR et al., 2013). Other protease production process was developed by RSM, reaching maximum production of 12.45 U mg<sup>-1</sup>, by a *Bacillus subtilis* strain (PARIMALA et al., 2012). Similar great results were verified by Siala et al. (2012), when RSM was employed to optimize the medium composition and culture

condition for *Aspergillus niger* protease production, corresponding to 183.13 U mL<sup>-1</sup>.

By applying a multiple regression, analysis to the experimental data the response of protease production by *F. oxysporum* could be carried out with the second order polynomial equation to establish predicted response. Taking into account only the significant terms was obtained the following equation:

$$PA = 24,93 + 7,95S + 2,03S^2 - 5,47pH - 3,87pH^2 + 3,31T - 1,90SpH + 2,33ST - 1,74pHT$$

where PA is the protease activity, S is the substrate concentration, pH is the pH of the medium and T is the cultivation time.

Fitted response-surface curves were plotted and are shown in Figure 1. The response curves to protease production reveal the most important factors and the interaction between them. Surface and regression coefficient analyses reveal that all the linear terms and quadratic variables for substrate concentration [S], incubation time [T] and pH of the medium [pH] were critical for protease production.

The culture conditions that provided the best alkaline protease ranges were 5.0% substrate concentration, pH 6.0 and cultivation time of 6.5 days (run 10 in Table 1). Under optimum conditions, *F. oxysporum* produced a range of 51.84 U mL<sup>-1</sup>. In other study with a *F. oxysporum* strain, the highest production of 70.5 U g<sup>-1</sup> was obtain after 72h of incubation, at 35 °C and pH 7,0, using rice bran as substrate (ALI; VIDHALE, 2013). Maximum protease production by *Aspergillus flavus* was reached after seven days, at pH 5.0, with 3% of wheat bran and 3% of KNO<sub>3</sub> as nitrogen source (60 U mg<sup>-1</sup> protein) (MUTHULAKSHMI et al., 2011). In other study, *Aspergillus fumigatus* present maximal protease activity (273 U mL<sup>-1</sup>) after 36 h of incubation (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

After optimization, a 14.85 fold increase in protease production (51.84 U mL<sup>-1</sup>) relative to the control medium (3.49 U mL<sup>-1</sup>) was obtained. Although many researchers have investigated the effects of process parameters on protease production, only few optimization studies have applied RSM analyses. Shankar et al. (2013) recently reported a 3.4-fold increase in protease production by *B. megaterium*, using a similar statistical approach. The *A. niger* protease production was improved 4.25-fold by optimizing the medium composition using RSM (SIALA et al., 2012). Parimala et al. (2012) optimized the alkaline protease production by *B. subtilis*, which was increased around 98%.

The validation of the statistical results was conducted under optimized conditions in triplicate (run 19, Table 1). It may be noted that the experimental protease level achieved in validation (50.45 U mL<sup>-1</sup>) nearly reached the levels obtained with optimized conditions (51.84 U mL<sup>-1</sup>), validating the model used.

*F. oxysporum* demonstrated be able to produce protease on efficient way using dog hair as sole carbon source. Similarly, the alternative residues fish meal and fish flour were employed as sole carbon source for alkaline proteases production by *Bacillus pumilus* and *A. fumigatus*, respectively (GUPTA et al., 2012; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011). Other studies showed the ability of *Bacillus* species to produce proteases using wool straight off sheep as sole substrate (HASSAN et al., 2013).

The high protease levels achieved in the present investigation shown that dog hair is a potential substrate for proteolytic enzyme production. This is the first report that suggests an alternative use for dog hair, an abundant waste. The use of dog hair can decrease protease production costs, as well avoid its incorrect deposition in the environment.

### 5.3.2 Dog hair degradation by *F. oxysporum*

The damage of dog hair degradation by *F. oxysporum* during enzyme production was established using SEM. The not digest hair was used by control. It can be noted the dog hair cuticle degradation by *F. oxysporum* (Figure 2 D-F), when compared to undigested hair (Figure 2 A-C), which presents intact keratin fibers.

Many studies used SEM to evaluate hair, wool and leather degradation by proteolytic microorganisms. It has proven to be an efficient technique to determine the damage caused by microbial proteases and to demonstrate how fungal hyphes stablish the hair degradation to obtain nutrients (ABRAHAM et al., 2014; CAVELLO et al., 2013; CHAYA et al., 2014; SENTHILVELAN et al., 2012).

### 5.3.3 Enzyme characterization

For industrial application, enzymes need show stability in high temperatures and determined pH values, according to the industrial application. For this reason, thermal and pH stabilities were investigated.

The optimum temperature of protease activity from *F. oxysporum* was 65 °C (Figure 3A). Conversely, the proteases obtained from *A. flavus* (MUTHULAKSHMI et al., 2011), *Aspergillus parasiticus* (ANITHA; PALANIVELU, 2013), *Beauveria* sp. (SHANKAR et al., 2011), *Botrytis cinerea* (ABIDI et al., 2011) and *Fusarium* sp. (UEDA et al., 2007) were active at 50 °C, while proteases from *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* exhibited optimum temperature at 60 °C (HASSAN et al., 2013).

The *F. oxysporum* proteases were stable at 50 °C, showing a half-life ( $T_{1/2}$ ) of 65 minutes (Figure 3C). In a similar way, other proteases presented better stability at 50 °C (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; SHANKAR et al., 2011).

The *F. oxysporum* protease showed maximum activity at pH 8.0 (Figure 3B). However, it was stable in the pH range 7.0 and 8.0 to 10.0 (Figure 3D). Usually, alkaline proteolytic enzymes exhibit optimal activity in a pH range of 7.0 to 10.0 (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; GEORGE et al., 2014; HASSAN et al., 2013; HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; MUTHULAKSHMI et al., 2011; SHANKAR et al., 2011; UEDA et al., 2007).

Like *F. oxysporum* proteases, some proteolytic enzymes showed stability in alkaline pH values, such as those from *A. fumigatus* (6.0-11.0) (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011) and *Vibrio metschnikovii* (7.0-11.0) (GEORGE et al., 2014). Therefore, other ones exhibited stability in a broad pH range, including those from *Beauveria* sp. (3.0-11.0) (SHANKAR et al., 2011), *B. cinerea* (4.0-11.0) (ABIDI et al., 2011) and *Fusarium* sp. (2.5-11.5) (UEDA et al., 2007). These results suggest that *F. oxysporum* protease can be applied in industrial process that demand high temperatures and stability from neutral to alkaline pH values.

To verify the effect of substances on protease activity, the crude filtrate was incubated with several metallic ions, solvents and others substances (Table 3). The metallic ions  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{3+}$  totally inhibited the enzyme activity. Conversely, some metallic ions enhanced *F. oxysporum* protease activity, like  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  and  $\text{Ba}^{2+}$  (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; HASSAN et al., 2013; MUTHULAKSHMI et al., 2011). The ions  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  may not have any influence of some microbial proteases (ABIDI et al., 2011), whereas  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  were considerably inhibitors of many alkaline proteases (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; MUTHULAKSHMI et al., 2011; SHANKAR et al., 2011).

A stimulatory effect on *F. oxysporum* proteases was observed in presence of some substances. The levels of protease activity were significantly higher in the presence of ethanol, isopropanol, Tween 80 and Tween 20, corresponded to 295.60%, 186.79%, 198.11% and 150.94%, respectively. Likewise, proteases from *Bacillus* sp. showed high activity in presence of Triton X-100 (HASSAN et al., 2013). The *Purpureocillium lilacinum* protease produced with the use of human hair was stable in the presence of DMSO, methanol, isopropanol, Triton X-100 and Tween 85 (CAVELLO et al., 2013). In opposite way, the alkaline protease from *B. cinerea* was inhibited by isopropanol, ethanol, methanol and DMSO

(ABIDI et al., 2011).

#### 5.4. Concluding remarks

The results showed that white dog hair is suitable substrate for protease production by *F. oxysporum* in submerged processes. The tools RSM and CCRD were effective in establishing the optimum conditions for the alkaline protease production by *F. oxysporum*. After optimization, a remarkable 14.85 fold increase in enzyme production was obtained. The biochemical properties showed by *F. oxysporum* proteases including pH and thermal stabilities and increased activity in a presence of many substances reveals their potential for use in detergent formulation. The use of dog hair residue as alternative substrate for protease production cannot only add value and decrease of amount of this residue, but also reduce protease production cost.

#### 5.5 Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the financial support and the scholarship awarded to the first author.

#### 5.6 References

- ABIDI, F.; CHOBERT, J.M.; HAERTLE, T.; MARZOUKI, M.N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ABRAHAM, J.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 74, p. 191–198, 2014.
- ADRIO, J. L.; DEMAINE, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.
- ALI, S. S.; VIDHALE, N. N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid- State Fermentation Using Rice Bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p.45-47, 2013.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v 88, p. 214-220, 2013.
- APHA. Animal and Plant Health Agency. Online Newsletter October 9th 2014. Available from: <<https://www.gov.uk/government/organisations/animal-and-plant-health-agency>>. Accessed: January 05th 2015.

BACH, E., SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochemistry*, v. 47, p. 2455-2462, 2012.

CAVELLO, I. C.; HOURS, R. A. ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. *Process Biochemistry*, v. 48, p. 972-978, 2013.

CFMV. Federal Board of Veterinary Medicine. Online Newsletter 03/08/2013. Available from: <<http://www.cfmv.gov.br/portal/destaque.php?cod=1155>>. Accessed: september, 16th 2014.

CHAYA, E.; SUZUKI, T.; KARITA, S.; HANYA, A.; YOSHINO-YASUDA, S.; KITAMOTO, N. Sequence analysis and heterologous expression of the wool cuticle-degrading enzyme encoding genes in *Fusarium oxysporum* 26-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 117, n. 6, p. 711-714, 2014.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 34, p. 372-384, 2014.

DODDAPANENI, K. K.; TATINENI, R.; POTUMARTHI, R.; MANGAMOORI, L. N. Optimization of media constituents through response surface methodology for improved production of alkaline proteases by *Serratia rubidaea*. *Journal of Chemistry, Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 721-729, 2007.

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of October 3rd 2002. Available from: <[http://europa.eu/legislation\\_summaries/](http://europa.eu/legislation_summaries/)>. Accessed: January 05th 2015.

EVANS, K. L.; CROWDER, J.; MILLER, E. S. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 46, n. 11, p. 1004-1011, 2000.

FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A., HMITED, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties. *Process Biochemistry*, v. 45, p. 617-626, 2010.

GEORGE, N.; CHAUHANA, P. S.; KUMARA, V.; PURIB, N.; GUPTA, N. Approach to ecofriendly leather: characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale. *Journal of Cleaner Production*, v. 79, p. 249-257, 2014.

GUPTA, R. K.; PRASAD, D.; SATHESH, J.; NAIDU, R. B.; KAMINI, N. R.; PALANIVEL, S.; GOWTHAMAN, M. K. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 22, n. 9, p. 1230-1236, 2012.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNNI, K. N.; SAJITH, S.;



PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIN, S. Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, n. 3, p. 39-51, 2013.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J. M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 5738-5773, 2014.

LAXMAN, R. S.; SONAWANE, A. P.; MORE, S. V. Optimization and scale up of production of alkaline protease from *Comidiobolus conoratus*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3152-3158, 2005.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 137-148, 2011.

HASSAN, M. A.; HAROUN, B. M.; AMARA, A. A.; SEROUR, E. A. production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

PARIMALA, T.; SNEHA, P.M.; RAO, C. S. V.; BABU, R. S. Response surface optimization of process variables for alkaline protease production by *Bacillus subtilis*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 228-236, 2012.

PODDAR, A.; GACHHUI, R.; JANA, S. C. Optimization of physico-chemical condition for improved production of hyperthermostable  $\beta$  amylase from *Bacillus subtilis* DJ5. **Journal of Biochemistry and Technology**, v. 3, n. 4, p. 370-374, 2012.

SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; MANDAL, A.B. Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 14, p. 889-897, 2012.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 579-585, 2011.

SHANKAR, T.; RAMA, R.; THANGAMATHI, P.; SIVAKUMAR, T. Keratinase production by *Bacillus megaterium* RS1 using the statistical tool central composite design. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 48, p. 6776-6784, 2013.

SHARMA, R.; CHOUDHARY, N. A study on role of keratinophilic fungi in nature: a review. **Biolife**, v. 2, n. 2, p. 690-701, 2014.

SIALA, R.; FRIKHA, F.; MHAMDI, S.; NASRI, M; KAMOUN, A. S. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* L1 on shrimp peptone using statistical experimental design. **The scientific world journal**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 169-172,

2005.

UEDA, M.; KUBO, T.; MIYATAKE, K.; NAKAMURA, T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.331–338, 2007.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for (medium N). **Microbial genetics bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.



**Table 1.** Experimental design used in RSM studies using three independent variables real (encoded values) of protease production by *F. oxysporum*.

Run	Real values (encoded)			
	Dog hair concentration (%)	Time (days)	pH	Alkaline protease activity (U mL <sup>-1</sup> )
1	1.8 (-1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)	19.84 ± 0.50
2	4.2 (1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)	28.56 ± 0.63
3	1.8 (-1)	8.6 (1)	4.2 (-1)	24.48 ± 0.48
4	4.2 (1)	8.6 (1)	4.2 (-1)	45.12 ± 0.48
5	1.8 (-1)	4.4 (-1)	7.8 (1)	12.64 ± 0.30
6	4.2 (1)	4.4 (-1)	7.8 (1)	16.36 ± 0.69
7	1.8 (-1)	8.6 (1)	7.8 (1)	12.92 ± 0.14
8	4.2 (1)	8.6 (1)	7.8 (1)	23.36 ± 0.28
9	1.0 (-1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)	13.16 ± 0.25
10	5.0 (1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)	51.84 ± 1.27
11	3.0 (0)	3.0 (-1.68)	6.0 (0)	24.88 ± 0.30
12	3.0 (0)	10.0 (1.68)	6.0 (0)	34.8 ± 0.42
13	3.0 (0)	6.5 (0)	3.0 (-1.68)	22.32 ± 0.48
14	3.0 (0)	6.5 (0)	9.0 (1.68)	9.28 ± 0.18
15	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	25.52 ± 0.50
16	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	25.44 ± 0.24
17	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	23.52 ± 0.87
18	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)	24.64 ± 1.00
19*	5.0 (1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)	50.45 ± 2.96

\* Values refer to validation of the model.

**Table 2.** ANOVA for the regression model and the estimated regression coefficient with corresponding *p* values representing alkaline protease activity.

Protease production						
Terms	SQ	MQ	DF	<i>F</i>	<i>F</i> <sub>tab</sub>	<i>F</i> / <i>F</i> <sub>tab</sub>
M	5522.36	613,60	9	47,30	2,10	22,525
RE	570.75	12,97	44	-	-	-
T	6093.11		53			
R <sup>2</sup>	90.63					

Terms	Coefficients	<i>p</i> -value
Mean/Intercept	<b>24.93 ± 1.04</b>	0.000
[S]	<b>7.95 ± 0.56</b>	0.000
[S] <sup>2</sup>	<b>2.03 ± 0.58</b>	0.001
pH	<b>-5.47 ± 0.56</b>	0.000
pH <sup>2</sup>	<b>-3.87 ± 0.58</b>	0.000
Temp	<b>3.31 ± 0.56</b>	0.000
Temp <sup>2</sup>	1.09 ± 0.58	0.068
[S] x pH	<b>-1.90 ± 0.73</b>	0.013
[S] x Temp	<b>2.33 ± 0.73</b>	0.003
pH x Temp	<b>-1.74 ± 0.73</b>	0.022

M: model; RE: Residue; T: Total, SQ: sum of squares; MQ: means of squares; DF: degree of freedom; *F*: Calculated *F*; *F* tab: Tabulated *F*; [S]: substrate concentration; T: cultivation time; pH: pH medium; Temp: Temperature. Values in bold are statistically significant.

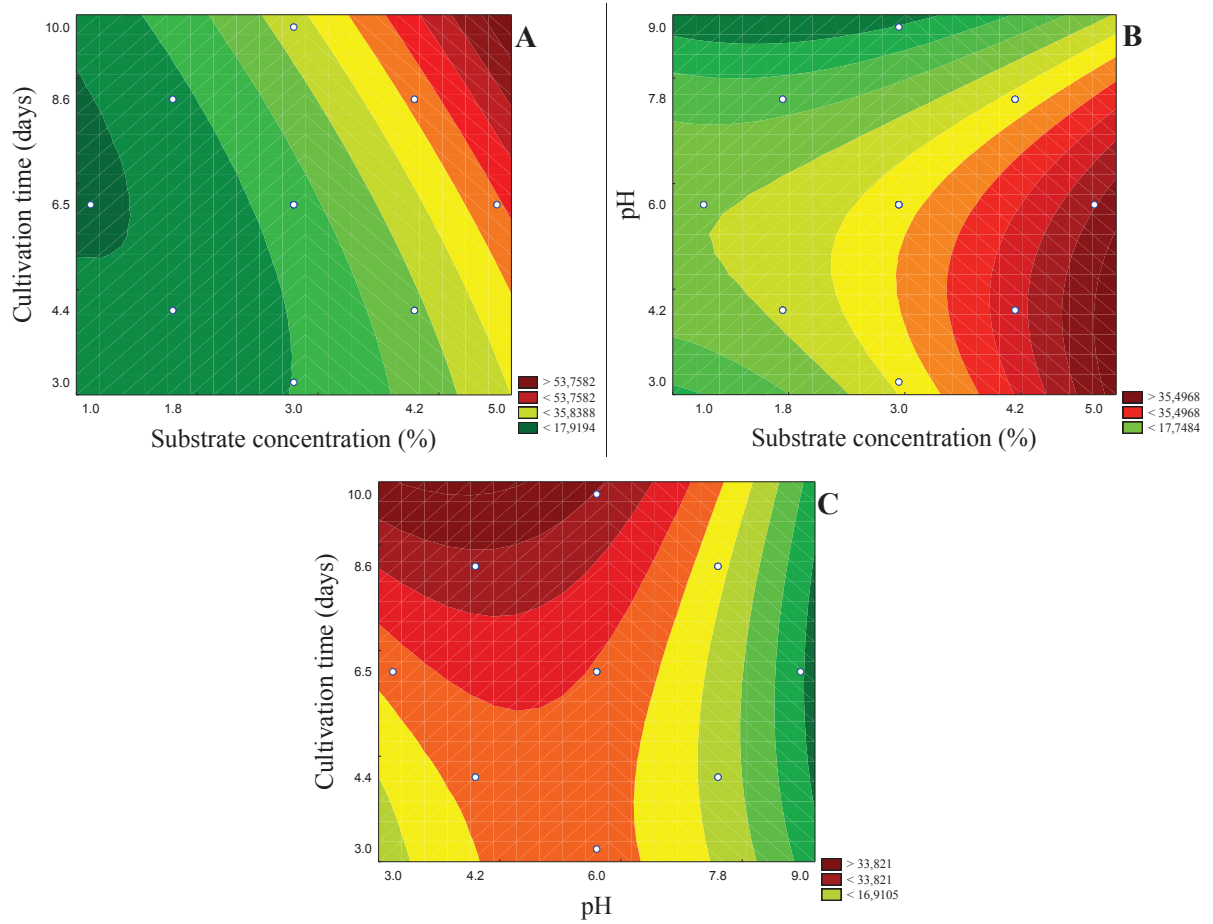
**Table 3.** Effect of different substances on proteolytic activity of *F. oxysporum*.

Substance	Relative activity	
	Final concentration	
	2 mM	10 mM
Control	100.00 ± 3.67	100.00 ± 0.94
CuSO <sub>4</sub>	66.86 ± 3.62	00.00 ± 0.00
ZnSO <sub>4</sub>	67.44 ± 4.04	00.00 ± 0.00
MnSO <sub>4</sub>	62.82 ± 2.51	32.45 ± 0.80
BaCl <sub>2</sub>	59.58 ± 1.25	43.30 ± 0.69
CaCl <sub>2</sub>	83.14 ± 2.96	49.19 ± 1.80
NH <sub>4</sub> Cl	69.52 ± 2.03	14.09 ± 1.06
NaCl	72.29 ± 0.87	17.21 ± 0.53
MgSO <sub>4</sub>	88.45 ± 2.03	19.98 ± 0.53
Sodium citrate	45.73 ± 0.60	42.49 ± 2.65
MnCl <sub>2</sub>	33.14 ± 1.97	22.63 ± 1.74
HgCl <sub>2</sub>	35.80 ± 4.60	00.00 ± 0.00
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	45.61 ± 2.69	00.00 ± 0.00
EDTA	42.73 ± 2.03	35.33 ± 0.35
β-mercaptoethanol	64.09 ± 0.87	53.12 ± 3.28

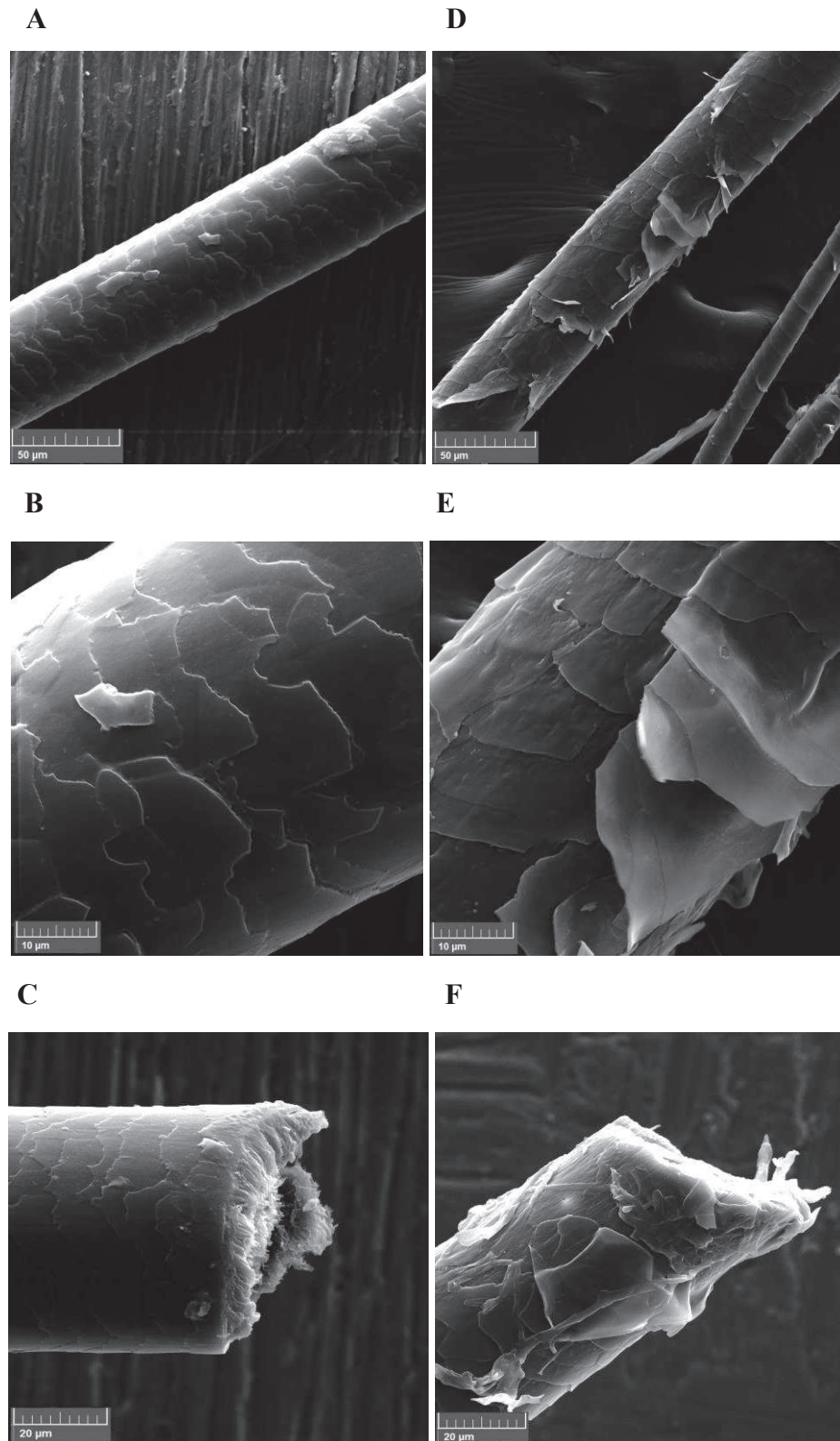
  

Substance	Final concentration	
	0,5%	1%
Methanol	99.37 ± 5.20	117.77 ± 2.60
Ethanol	198.43 ± 8.13	295.60 ± 7.86
Isopropanol	178.93 ± 7.68	186.79 ± 11.59
Tween 20	110.85 ± 4.09	150.94 ± 9.10
Tween 80	107.08 ± 5.72	198.11 ± 11.61
Triton X-100	84.43 ± 4.09	108.81 ± 2.60
DMSO	115.41 ± 4.53	108.18 ± 1.66

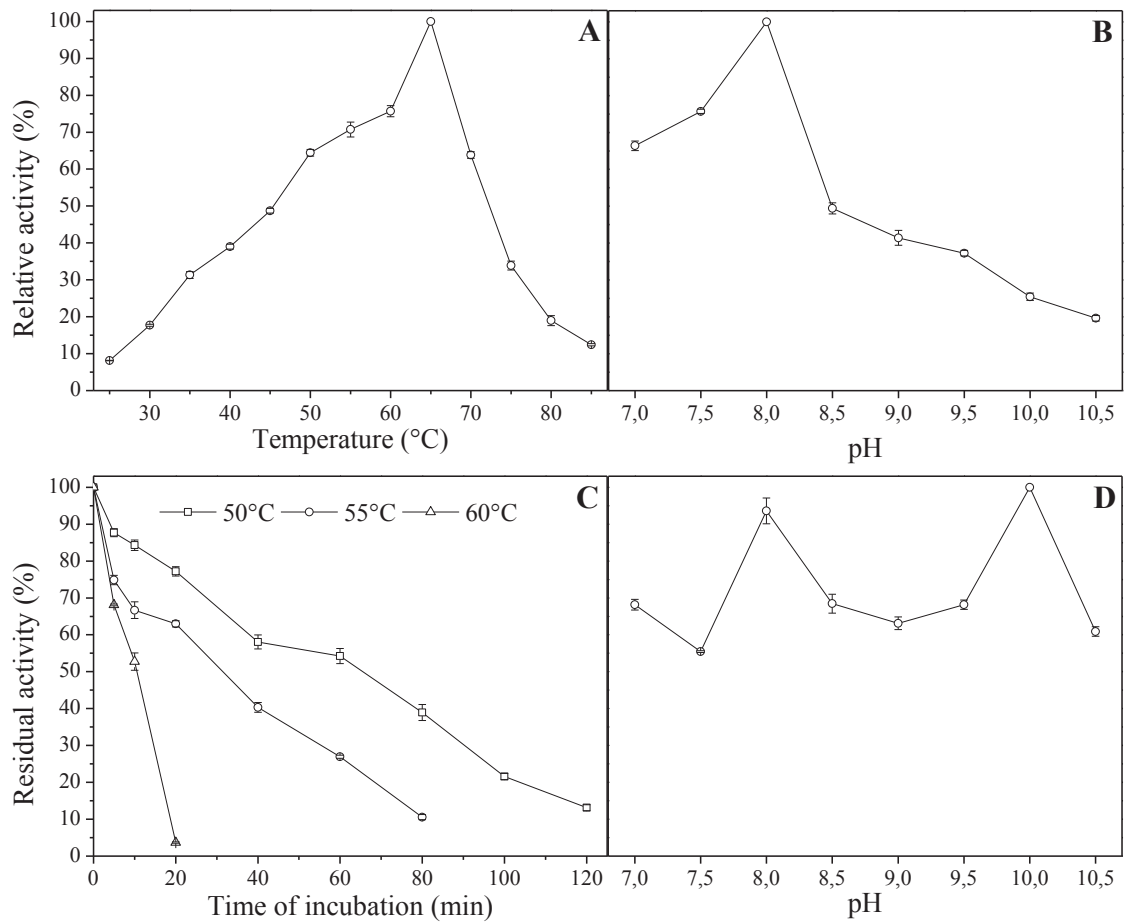
EDTA: disodium ethylenediaminetetracetate, DMSO: dimethylsulfoxide.



**Figure 1.** Fitted response-surface contour plots for enzymatic activity as a function of cultivation time and substrate concentration (A), medium pH and substrate concentration (B) and medium pH and cultivation time (C) on alkaline protease production by *F. oxysporum* using white dog hair as substrate.



**Figure 2.** Scanning electron microscopy of dog hair. Figures A, B and C shows control hair, which was not applied treatment and Figures D, E and F presents degraded hair fibers by *F. oxysporum* on submerged cultivation after 6.5 days.



**Figure 3.** Influence of temperature (A) and pH (B) on alkaline protease activity. Plates C and D represent thermal and pH stability of this enzyme.

## 6. CAPÍTULO III

### Optimization of alkaline protease production by *Fusarium oxysporum* on dog hair using statistical experimental design

Prolo, T.<sup>1</sup>, Izidoro, S.C.<sup>1</sup>; Lima, V.A.<sup>2</sup>, Knob, A.<sup>1\*</sup>.

#### Abstract

Interest in proteolytic enzymes has been increasing, with a growing realization of their potential usefulness in biotechnology, including leather, food and textile industries, bioremediation processes and medical diagnoses. In recent years, several investigations have focused on ways of producing microbial proteases using inexpensive media. The objective of this work was to produce protease by a *Fusarium oxysporum* strain, using black dog hair as sole substrate. In addition, the enzymes produced were biochemically characterized, in order to infer possible biotechnological applications. The effects of pH of medium, cultivation time and black dog hair concentration on protease production were evaluated using a Central Composite Rotational Design (CCRD) combined with Response Surface Methodology (RSM). The better cultivation conditions established were 8.6 days of cultivation, pH 4.2 and 4.2 % substrate concentration. After optimized cultivation conditions, the protease production were increased 7.19 fold, compared to the initial conditions. The enzyme showed optimal activity at 65 °C and pH 8.5 and was at 55 °C and in pH range of 7.0-10.5. An increasing in protease activity was observed in the presence of Zn<sup>2+</sup> and was stable in the presence of Mg<sup>2+</sup>. The enzymatic properties of this protease suggest its suitable application in leather processing. This study, therefore, presents black dog hair, a cheap cost and widely available residue, as an attractive substrate for the production of microbial proteases, in an industrial point of view.

Key-words: proteolytic enzymes, central composite design, filamentous fungi, response surface methodology.

## 6.1 Introduction

Protease is one of the most important commercial enzymes, representing, approximately, 60% of total commercially enzymes in all world. They are very specific and have a broad applicability on industrial process, including cheese-making, dehairing, baking, brewing and pharmaceutical industries (GEORGE-OKAFOR; ODIBO, 2011; UPADHYAY et al., 2010).

In recent years, the market for enzymes is increasing. The application of enzymes in industrial process can contribute for a decline production cost. In addition, its use may result in achievement of more efficient and cost-effective processes (LI, et al., 2013; TAVANO, 2013).

Proteases could be obtained from many sources, such as microorganisms, plants and animals. Microorganisms are often the preferred protease production systems, because they can be artificially cultured in large quantities in a relatively short time by established fermentations methods (MIENDA et al., 2014). However, the production of most microbial proteases involves the use of expensive refined substrates, which tend to increase the production cost (GEORGE-OKAFOR; MIKE-ANOSIKE, 2012). Therefore, it has become necessary to consider alternative substrates for microbial protease production. In this context, the utilization of residues is particularly interesting, which not only serve as cost-effective substrates, but also offer environmental advantages (ABIDI et al., 2011; JEGANNATHAN; NIELSEN, 2013; KNOB et al., 2014).

It is estimated that the number of the pets in Brazil is about 106 million, which generate a huge demand of care. Many animals need dehearing services offered by pet shops, in order to maintain their health and neatness. These establishments are responsible for generate a high quantities of dog hair residue, that could be potentially infectious. Like many other residues, dog hair has no commercial value and its deposition on a large-scale can results in a serious environmental problem, offering risks to other organisms. Additionally, the appropriate destination for this residue generally imply significantly costs (APHA, 2014; CFMV, 2013; EUROPEAN UNION, 2002).

The investigation of low cost substrates easily available such as dog hair residue became a necessity opening new avenues for their effective utilization. In this way, in the present study, we explored the optimum fungal growth conditions for the alkaline protease production by *Fusarium oxysporum*, using black dog hair as substrate. In addition, we further characterized the proteases that were produced, in order to infer potential biotechnological



applications of these enzymes.

## 6.2 Material and Methods

### 6.2.1 Residue material

Dog hair was obtained from locally *pet shop*. The residue was collected from distinct animals and separated by color. For this purpose, only black hair was used. It was prepared by exhaustive washing with distilled water and drying at 40 °C, for 48-72 hours.

### 6.2.2 Microorganism and culture conditions

*F. oxysporum* was isolated from contaminated oil (diesel). The fungus was grown on Vogel's solid medium (VOGEL, 1956) containing 1.5% (m/v) glucose and 1.5% (m/v) agar, at 28 °C, for 7 days for conidia production. Submerged fermentation was carried out in 125 mL flasks containing 25 mL of Vogel's liquid medium (VOGEL, 1956), pH 6.5 and inoculated with 1.0 mL spore suspension ( $1.0 \times 10^7$  spores/mL). The cultures were incubated at different conditions according to the experimental design. Following incubation, they were vacuum filtered and the crude extract was assayed for protease activity.

### 6.2.3 Enzymatic assay

The alkaline proteolytic activity was determined according to Tremacoldi and Carmona (2005), with minor modifications. For this, 3 mL of appropriately diluted crude extract was incubated with 3 mL of casein at 2% (w/v) in the Tris-HCl buffer pH 9.0, for 5 min at 37 °C. The reaction was stopped by 2 mL of 10 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) addition, followed by centrifugation at 4000 x g for 20 min. The proteolytic activity was determined by the absorbance reading of the supernatant at 280 nm, against an appropriate blank. One unit of enzyme activity (U) was defined as the amount of enzyme catalyzing an increase of 0.1 in the absorbance at 280 nm, per mL of sample, during 1 h. The enzyme assay was performed in triplicated and results are represented as mean values.

### 6.2.4 Optimization of alkaline protease production

In this study, a central composite rotatable design was employed to determine the effect of independent variables on response and to optimize the protease production. For this

purpose, 18 runs of experiment were formed with six axial points at central points, three replications at the axial points for fitting a second order model. All the statistical and mathematical analyses of the results was done to evaluate the effects of variables and their interactions. The dimensional surface plots were drawn to shown of independent variables on response and a quadratic polynomial equation was proposed to describe the mathematical relationships between the independent variables and the response.

Table 1 presents the experimental design employed for alkaline protease production using black dog hair as substrate. This methodology specifically allows the modeling of a second order equation that describes the protease production process. The results were analyzed by linear multiple regression analysis through the least squares method to fit the following equation:

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \varepsilon$$

where Y is the measured response;  $\beta_0$  is the intercept term;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  and  $\beta_3$  are linear coefficients,  $\beta_{11}$ ,  $\beta_{22}$  and  $\beta_{33}$  are quadratic coefficients;  $\beta_{12}$ ,  $\beta_{13}$  and  $\beta_{23}$  are interaction coefficients and  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  represent the independent variables: substrate concentration [S], cultivation time (T) and pH of medium (pH), respectively. The term  $\varepsilon$  represents the experimental error.

The combination of different optimized variables, which yielded the maximum response, was experimentally validated by culturing *F. oxysporum* under optimized production conditions, in triplicate. For this purpose, dog hair from other animals than those employed in process optimization were used.

#### 6.2.5. Scanning electron microscopy (SEM) images

In order to characterize the degradation of hair wast by *F. oxysporum*, samples of hair were subjected to SEM studies, using scanning electron microscopy VEGA 3, TESCAN, with SE detector, tungsten heated cathode at 20KV of accelerate voltage and 10mm field of view. Samples treated and untreated were freeze-dried and metallized by depositing a layer of gold through the sputtering technique for the sample become conductive.

#### 6.2.6. Dog hair characterization using fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

The fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analyses were carried out on Frontier spectrophotometer (Perkin Elmer®). FTIR spectra were recorded in the wavenumber

range between 4000 and 400  $\text{cm}^{-1}$ , averaging 32 scans per sample using a nominal resolution of 2  $\text{cm}^{-1}$  employing background spectrum of gold. A set of four samples were prepared, using 95 mg of KBr and 5 mg (5% - m/m) of each dog hair sample. Each sample was read in spectrophotometer in duplicate.

## 6.2.7 Enzyme characterization

### 6.2.7.1 Optimum temperature and pH

The optimum temperature was determined by measuring the activity at temperatures of 25 °C to 85 °C, at intervals of 5 °C, at pH 9.0. Optimum pH was determined using casein 2% (w/v) as substrate, in McIlvaine buffer (pH 7.0 - 7.5), Tris-HCl buffer (pH 8.0 - 9.0), and glycine-NaOH buffer (pH 9.5 – 10.5), at intervals of 0.5 units.

### 6.2.7.2 Protease thermostability and pH stability

The thermal stability was measured by incubating the crude filtrate for different periods, at 50 °C, 55 °C and 60 °C. Following incubation, the enzyme solution was frozen and the remaining activity was determined. For pH stability assays, the culture filtrate was diluted (1:2 v/v) in McIlvaine (pH 7.0 - 7.5), Tris-HCl (pH 8.0 - 9.0), and glycine-NaOH (pH 9.5 - 10.5) buffers, at intervals of 0.5 units, and incubated at 4 °C. After 24 h, the residual alkaline protease activity was determined.

### 6.2.7.3 Effect of metallic ions and other compounds on protease activity

The effect of metallic ions, disodium ethylenediaminetetracetate (EDTA) and  $\beta$ -mercaptoethanol was evaluate at 2 mM and 10 mM concentrations. In addition, the effect of methanol, ethanol, isopropanol, Tween 20, Tween 80, Triton X-100 and dimethylsulfoxide (DMSO) on protease activity was measured at concentrations of 0.5% and 1%. The residual activities were determined in relation to the control by performing the enzyme activity assay, under optimal conditions.

## 6.3 Results and Discussion

### 6.3.1 Optimization of *F. oxysporum* protease production using response surface

## methodology

Among 73 strains, a particular specie of *F. oxysporum* that was isolated from contaminated oil (diesel), have attracted attention for alkaline protease production using dog hair as sole culture substrate. In this way, two different colors of dog hair were tested, white and black (data not shown). Previous results showed that the protease production is influenced by distinct factors, according to the dog hair color. In addition, the highest protease levels were observed with the use of black dog hair, corresponding to 10.13 U mL<sup>-1</sup>.

Cavello et al. (2013) reported that a *Purpureocillium lilacinum* strain was able to produce alkaline proteases, using human hair as sole substrate. However, no report in the literature regarding the protease production by microorganisms using dog hair as substrate exists. Nevertheless, microbial proteases have been produced using other residues, including pig hair (VÁZQUEZ et al., 2008), wool straight off sheep (HASSAN et al., 2013), feather meal (DAROIT et al., 2011; SHANKAR et al., 2013), fish meal (GUPTA et al., 2012) and fish flour (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011).

Some experiments were also conducted previously in order to determine the parameters that affect protease production by *F. oxysporum*, using the experimental knowledge of one variable at a time approach for taking the range of each variable. Dog hair concentration, pH of medium and cultivation time were identified as the most influential process parameters in this process (data not shown). Therefore, the effect of these three variables on enzyme production was evaluated using central composite design (CCRD) combined with response surface methodology (RSM). In Table 1 are shown the experimental design used in RSM and results that were obtained.

The models parameters were analyzed by ANOVA for alkaline protease production (Table 2). F-values implied that the models are significant ( $p < 0.05$ ). High coefficient of determination was obtained for alkaline protease production, corresponding to 0.8957. The ANOVA analysis of the optimization study indicated that the model could explain 89.57 % variation response. It suggests that the models are accuracy for explaining protease production.

The overall second-order polynomial equation describes the relationships between the variables and protease production, in terms of codes values:

$$PA = 27,28 + 5,88S - 13,46pH + 4,21T - 3,48T^2 - 8,13SpH - 8,39pHT$$

where PA is the protease activity, S is the substrate concentration, pH is the pH of the medium and T is the cultivation time.

The response curves to protease production show the most important factors and the interaction between them. Surface and regression coefficient analyses reveal that all the linear terms and quadratic variables for substrate concentration [S], incubation time [T], pH of the medium [pH] were critical for alkaline protease production by *F. oxysporum*. As shown in Figure 1 (A, B and C) the increase in pH of medium resulted in low protease yield. An improvement in the protease activity was observed with increase in substrate concentration and cultivation time.

Under optimum conditions, *F. oxysporum* produced high levels of alkaline protease, corresponding to 72.8 U mL<sup>-1</sup>. The best culture conditions established were 4.2% substrate concentration, pH 4.2 and cultivation time of 8.6 days (run 4 in Table 1). After optimization, a 7.19 fold increase in protease production (72.8 U mL<sup>-1</sup>) relative to the control medium (10.13 U mL<sup>-1</sup>) was obtained. Even though the effects on protease production of process parameters was extensively investigated, just a few optimization studies have applied RSM analyses.

Other *F. oxysporum* strain showed high protease levels (70.5 U g<sup>-1</sup>) after 72 h of incubation, at 35 °C and pH medium 7.0, with rice bran as solid-medium substrate (ALI; VIDHALE, 2013). Parimala et al. (2012), with the use of CCRD statistical approach, reached an optimum protease production of 12.45 U mL<sup>-1</sup> by *Bacillus subtilis*, after 24 h of incubation, pH medium 7.0 and 2.09% of substrate concentration. Thus, with the optimization, the alkaline protease production was improved at 98%. A 3.4-fold increase in the protease production by *Bacillus megaterium* was obtained when the statistical tool CCRD was used (SHANKAR et al., 2013). Hassan et al. (2013) obtained a high protease production by *Bacillus amyloliquefaciens* (922 U mL<sup>-1</sup>) and by *B. subtilis* (814 U mL<sup>-1</sup>), when these strains were cultivated in the presence of 1 % wool straight off sheep as sole carbon source, pH medium 7.0, after 5 days of incubation.

The validation of the statistical results was conducted under optimized conditions in triplicate (run 19, Table 1). The results show that the experimental protease level achieved in validation (65.65 U mL<sup>-1</sup>) agrees with the proteases levels of 72.8 U mL<sup>-1</sup> reached in optimization process, validating the model used.

The high levels proteases achieved in the present investigation suggest that *F. oxysporum* is a promising strain for protease production by submerged fermentation, using as carbon source a low-cost and unexplored residue.

### 6.3.2 SEM of dog hair degradation by *F. oxysporum*

The scanning electron microscope images (SEM) of dog hair were shown on Figure 2. The damage caused on the hair were cleaner appear. It can be noted the superficial damage on digested hair cuticle (Figure 2D, E, F) when compared to the undigested hair (Figure 2A, B, C). On Figure 2D can be observed *F. oxysporum* hyphes and the cortex hair completed exposed.

Many studies have been used SEM to determine the damage caused by microorganism's proteases on hair, wool and leather. It have been considered an efficient method to determine hair degradation (ABRAHAM et al., 2014; CAVELLO et al., 2013; CHAYA et al., 2014; SENTHILVELAN et al., 2012).

### 6.3.3 Dog hair characterization by FTIR analyses

The FTIR analyses reveled peaks and bands characteristics of organic functional groups present in proteins and triglycerides (Figure 3). Research studies involving the dog hair composition analysis are rare in the literature. Wertz and Downing (1989) evaluated the dog hair composition and determined that it consists of methyl eicosanoic acid (18-MEA), palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1) and cholesterol.

The composition of dog hair keratin from *Canis lupus familiaris* was also previously reported in the literature. This protein is predominantly composed of glycine (20.66%), serine (10.16%) and leucine (8.20%) (WERTZ; DOWNING, 1989). In addition, the other 17 amino acids standard found in proteins were also described (NCBI - National Center for Biotechnology Information, accession number XM\_003433501).

### 6.3.4 Enzyme characterization

The alkaline protease from *F. oxysporum* showed optimum activity at 55 °C and 65 °C. This result suggests the presence of different isoforms in *F. oxysporum* crude extract (Figure 4A). Similar optimal temperatures have been reported for other microorganisms including *Vibrio metschnikovii* (GEORGE et al., 2014), *Aspergillus fumigatus* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011), *B. amyloliquefaciens* and *B. subtilis* (HASSAN et al., 2013).

The *F. oxysporum* protease exhibited high stability at 55 °C, showing a half-life ( $T_{1/2}$ ) of 150 minutes. At 60 °C, its half-life ( $T_{1/2}$ ) was around 65 minutes (Figure 4C). This enzyme is more thermostable than many fungal proteases, including those from *Botrytis cinerea*,

*Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Beauveria* sp. (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; MUTHULAKSHMI et al., 2011; SHANKAR et al., 2011).

This study showed that the best pH for protease activity was 8.5 (Figure 4B). Many studies reported a broad optimum pH range for microbial proteases. Among several alkaline proteases, the optimum pH varies to 8.0 to 10.0 (ABIDI et al., 2011; GEORGE et al., 2014; HASSAN et al., 2013; SHANKAR et al., 2011; UEDA et al., 2007).

The *F. oxysporum* protease was founded to be stable over pH range of 7.0 to 9.0 (Figure 4D). Likewise, the proteases from *A. fumigatus* and *V. metschnikovii* were stable at pH 6.0-11.0 and 7.0-11.0, respectively (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; GEORGE et al., 2014). Conversely, other microbial proteases showed pH stability in a wide pH range, such those from *Beauveria* sp. (3.0-11.0) (SHANKAR et al., 2011), *B. cinerea* (4.0-11.0) (ABIDI et al., 2011) and *Fusarium* sp. (2.5-11.5) (UEDA et al., 2007).

According to Maghsoodi et al. (2013), proteases with optimal activity at high temperatures and high activity and stable at high alkaline ranges are interesting for bioengineering and biotechnological applications. The biochemical properties showed by *F. oxysporum* proteases reveals their potential use in leather processing.

The effect of substances and several metallic ions on protease activity was investigated (Table 4). Stimulatory effect on protease activity was observed in the presence of  $Zn^{2+}$  (131.52%). However, the enzyme activity was totally inhibited by  $Pb^{3+}$  and  $Hg^{2+}$  at 10mM concentration. According to Daroit et al. (2011), the effect of different substances on proteases is usually highly variable, depending on their nature and concentration.

Similar to our results, the ion  $Zn^{2+}$  showed to be an activator of proteases from *A. flavus* (MUTHULAKSHMI et al., 2011) and *B. cinerea* (ABIDI et al., 2011). However, this ion inhibited some previously reported metalloproteases, such as *A. parasiticus* enzymes (ANITHA; PALANIVELU, 2013). Furthermore, it has been observed that some metallic ions are inhibitors of other microbial proteases, like  $Hg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  (ABIDI et al., 2011; MUTHULAKSHMI et al., 2011; SHANKAR et al., 2011). On the other hand, some others metallic ions could enhance the protease activity, including  $Ba^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  (ABIDI et al., 2011; ANITHA; PALANIVELU, 2013; HASSAN et al., 2013; MUTHULAKSHMI et al., 2011). In addition, the ions  $Hg^{2+}$  and  $Mn^{2+}$  not show effect on *B. cineria* proteases (ABIDI et al., 2011).

*F. oxysporum* alkaline protease activity was inhibited in presence of all solvents evaluated. Similar results were founded in other studies that showed protease inhibition by EDTA, (HASSAN et al., 2013), isopropanol, ethanol, methanol (ABIDI et al., 2011) and SDS



(DAROIT et al., 2011). In opposite way, a protease produced by *P. lilacinum* exhibited stability in the presence of methanol, isopropanol, Triton X-100 and Tween 85 (CAVELLO et al., 2013).

#### 6.4 Concluding remarks

This study reveals the potential of black dog hair as an attractive and promising substrate for alkaline proteases production by *F. oxysporum*. The statistical tools RSM and CCRD were effective in establishing the optimum conditions for the protease production, resulting in a 7.19-fold increase in enzyme activity. The biochemical properties showed by *F. oxysporum* proteases reveals their potential use in leather processing. The use of black dog hair in this bioprocess can not only add value and decrease of amount of this residue, but also reduce protease production cost. In addition, it could open new avenues for the bioconversion of this residue into other value added products.

#### 6.5 Acknowledgements

The authors would like to thank CAPES (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the financial support and the scholarship awarded to the first author.

#### 6.6 References

- ABIDI, F.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ABRAHAM, J.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Substitution of chemical dehairing by proteases from solid-state fermentation of hair wastes. **Journal of Cleaner Production**, v. 74, p. 191–198, 2014.
- ALI, S. S; VIDHALE, N. N. Protease Production by *Fusarium oxysporum* in Solid- State Fermentation Using Rice Bran. **American Journal of Microbiological Research**, v. 1, n. 3, p.45-47, 2013.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v 88, p. 214-220, 2013.
- APHA. Animal and Plant Health Agency. Online Newsletter October 9th 2014. Available from: <<https://www.gov.uk/government/organisations/animal-and-plant-health-agency>>. Accessed: January 05th 2015.



CAVELLO, I. C.; HOURS, R. A. ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 972-978, 2013.

CFMV. Federal Board of Veterinary Medicine. Online Newsletter 03/08/2013. Available from: <<http://www.cfmv.gov.br/portal/destaque.php?cod=1155>>. Accessed: september, 16th 2014.

CHAYA, E.; SUZUKI, T.; KARITA, S.; HANYA, A.; YOSHINO-YASUDA, S.; KITAMOTO, N. Sequence analysis and heterologous expression of the wool cuticle-degrading enzyme encoding genes in *Fusarium oxysporum* 26-1. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 711-714, 2014.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of father meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51, 2011.

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of October 3rd 2002. Available from: <[http://europa.eu/legislation\\_summaries/](http://europa.eu/legislation_summaries/)>. Accessed: January 05th 2015.

GEORGE, N.; CHAUHANA, P. S.; KUMARA, V.; PURIB, N.; GUPTA, N. Approach to ecofriendly leather: characterization and application of an alkaline protease for chemical free dehairing of skins and hides at pilot scale. **Journal of Cleaner Production**, v. 79, p. 249–257, 2014.

GEORGE-OKAFOR, U. O.; MIKE-ANOSIKE, E. E. Screening and Optimal Protease Production by *Bacillus* sp. Sw-2 Using Low Cost Substrate Medium. **Research Journal of Microbiology**, n. 7, p. 327-336, 2012.

GEORGE-OKAFOR, U. O.; ODIBO, F. J. C. Purification and Some Properties of Thermostable Alkaline Serine Protease from Thermophilic *Bacillus* sp. Gs-3. **Journal of Biological Sciences**, n. 11, p. 299-306, 2011.

GUPTA, R. K.; PRASAD, D.; SATHESH. J.; NAIDU, R. B.; KAMINI, N. R.; PALANIVEL, S.; GOWTHAMAN, M. K. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 1230-1236, 2012.

HASSAN, M. A.; HAROUN, B. M.; AMARA, A. A.; SEROUR, E. A. production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRAL, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁN. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001-2006, 2011.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240, 2013.

KNOB, A.; FORTKAMP, D.; PROLO, T.; IZIDORO, S. C.; ALMEIDA, J. M. Agro-residues as alternative for xylanase production by filamentous fungi. **BioResources**, v. 9, n. 3, p. 5738-

5773, 2014.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

MAGHSOODI, V.; KAZEMI, A.; NAHID, P.; YAGHMAEI, S.; SABZEVARI, M. A. Alkaline protease production by immobilized cells using *Bacillus licheniformis*. **Scientia Iranica**, v. 20, p. 607-610, 2013.

MIENDA, B. S.; SHAMSIR, M. S.; SHEHU, I.; DEBA, A. A.; GALADIMA, A. A. In silico metabolic engineering interventions of *Escherichia coli* for enhanced ethanol production, based on gene knockout simulation. **IIOAB Journal**, v. 5, n. 2, p. 16–23, 2014.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 137-148, 2011.

NCBI. National Center for Biotechnology Information. PREDICTED: *Canis lupus familiaris* keratin, type II cytoskeletal 3-like (LOC100683401), transcript variant 1, mRNA. Available from: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/345791832>>. Accessed: November, 14th 2014.

PARIMALA, T.; SNEHA, P.M.; RAO, C. S. V.; BABU, R. S. Response surface optimization of process variables for alkaline protease production by *Bacillus subtilis*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 228-236, 2012.

SENTHILVELAN, T.; KANAGARAJ, J.; MANDAL, A.B. Application of enzymes for dehairing of skins: cleaner leather processing. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 14, p. 889-897, 2012.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 579-585. 2011.

SHANKAR, T.; RAMA, R.; THANGAMATHI, P.; SIVAKUMAR, T. Keratinase production by *Bacillus megaterium* RS1 using the statistical tool central composite design. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 48, p. 6776-6784, 2013.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11, 2013.

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 169–172. 2005.

UEDA, M.; KUBO, T.; MIYATAKE, K.; NAKAMURA, T. Purification and characterization of fibrinolytic alkaline protease from *Fusarium* sp. BLB. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.331–338, 2007.

UPADHYAY, M.K.; KUMAR, R.; KUMAR, A.; GUPTA, S.; KUMARI, M. Optimization and characterization of an extracellular proteases from *Aspergillus flavus* MTCC 277. **African journal of agricultural research**, n. 5, p. 1845-1850, 2010.

VÁZQUEZ, I. R., AGUILERA, A. F.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; AGUILAR, C. N. Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. **Información Tecnológica**, v.

19, n. 2, p. 33-40, 2008.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for (medium N). **Microbial genetics bulletin**, v. 13, p. 42-43. 1956.

WERTZ, P.W.; DOWNING, D.T. Integral lipids of mammalian hair. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 92B:759-761, 1989.

**Table 1.** Experimental conditions and results of the statistical experimental design for protease production by *F. oxysporum*.

Run	Real values (encoded)				Alkaline protease activity (U mL <sup>-1</sup> )
	Dog hair concentration (%)	Time (days)	pH		
1	1.8 (-1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)		10.8 ± 0.21
2	4.2 (1)	4.4 (-1)	4.2 (-1)		44.88 ± 1.46
3	1.8 (-1)	8.6 (1)	4.2 (-1)		43.6 ± 0.50
4	4.2 (1)	8.6 (1)	4.2 (-1)		72.8 ± 3.12
5	1.8 (-1)	4.4 (-1)	7.8 (1)		10.84 ± 0.39
6	4.2 (1)	4.4 (-1)	7.8 (1)		15.36 ± 0.67
7	1.8 (-1)	8.6 (1)	7.8 (1)		13.04 ± 0.14
8	4.2 (1)	8.6 (1)	7.8 (1)		6.76 ± 0.28
9	1.0 (-1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)		13.77 ± 0.58
10	5.0 (1.68)	6.5 (0)	6.0 (0)		24.96 ± 0.24
11	3.0 (0)	3.0 (-1.68)	6.0 (0)		12.0 ± 0.32
12	3.0 (0)	10.0 (1.68)	6.0 (0)		13.88 ± 0.25
13	3.0 (0)	6.5 (0)	3.0 (-1.68)		44.16 ± 0.72
14	3.0 (0)	6.5 (0)	9.0 (1.68)		9.84 ± 0.24
15	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)		29.12 ± 0.37
16	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)		24.52 ± 0.76
17	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)		29.76 ± 1.05
18	3.0 (0)	6.5 (0)	6.0 (0)		27.28 ± 0.37
19*	4.2 (1)	8.6 (1)	4.2 (-1)		65.65 ± 3.39

\* Values refer to validation of the model.

**Table 2.** ANOVA for the model regression and estimated regression coefficient values for protease production by *F. oxysporum*.

Protease production						
Terms	SQ	MQ	DF	F	$F_{tab}$	F/F <sub>tab</sub>
M	13618.18	1513.13	9	42.00	2.10	20.00
RE	1585.00	36.02	44			
T	15203.18		53			
R <sup>2</sup>	89.57					

Terms	Coefficients	p-value
Mean/Intercept	<b>27.28 ± 1.73</b>	0.000
[S]	<b>5.88 ± 1.94</b>	0.000
[S] <sup>2</sup>	-1.21 ± 0.97	0.221
pH	<b>-13.46 ± 0.94</b>	0.000
pH <sup>2</sup>	1.49 ± 0.97	0.134
Temp	<b>4.21 ± 0.94</b>	0.000
Temp <sup>2</sup>	<b>-3.48 ± 0.97</b>	0.001
[S] x pH	<b>-8.13 ± 1.22</b>	0.000
[S] x Temp	-1.96 ± 1.22	0.117
pH x Temp	<b>-8.39 ± 1.22</b>	0.000

M: model; RE: Residue; T: Total, SQ: sum of squares; MQ: means of squares; DF: degree of freedom; F: Calculated F; F tab: Tabulated F; [S]: substrate concentration; T: cultivation time; pH: pH medium; Temp: Temperature. Values in bold are statistically significant.

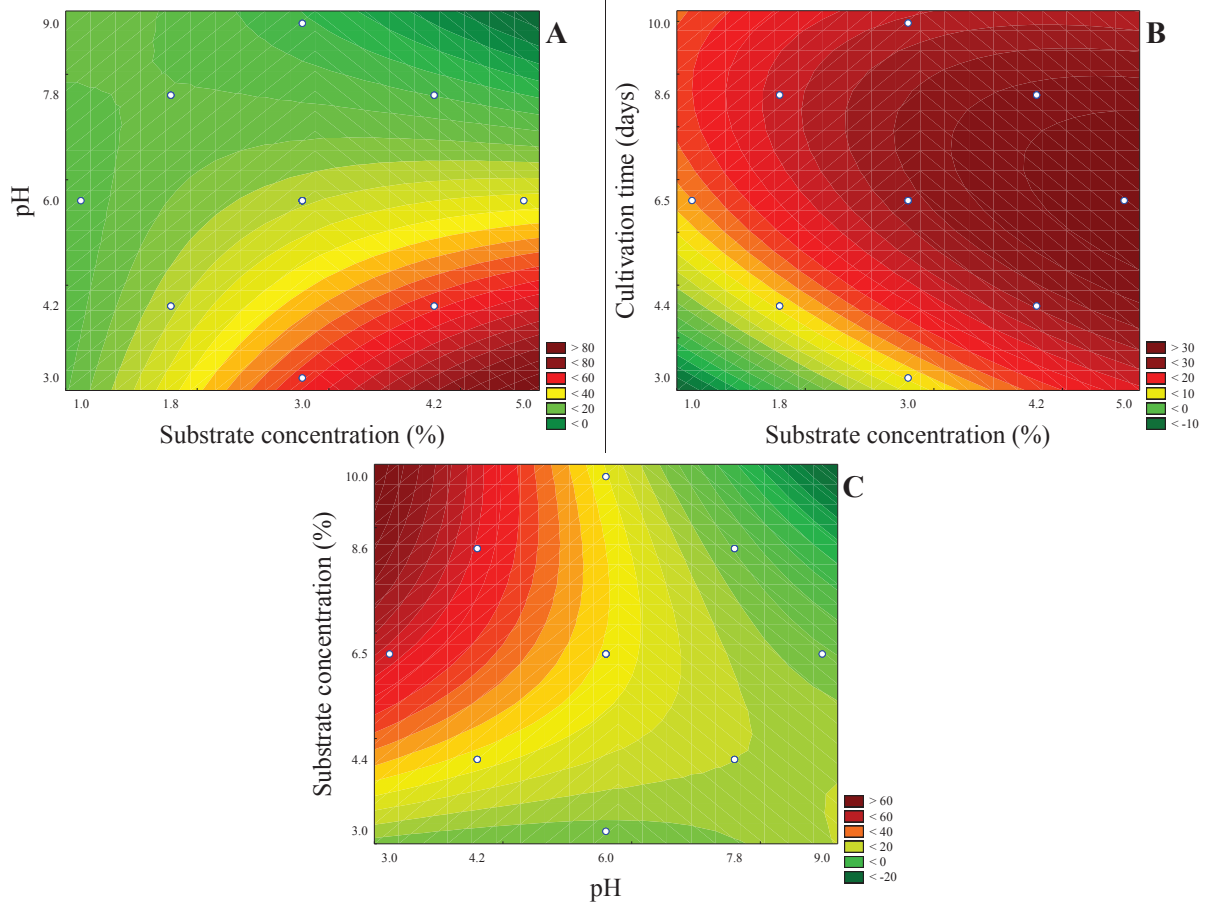
**Table 3.** Effect of different substances on proteolytic activity from *F. oxysporum*.

Relative activity		
Substance	Final concentration	
	2mM	10mM
Control	100.00 ± 2.17	100.00 ± 2.17
CuSO <sub>4</sub>	37.56 ± 2.37	29.27 ± 0.54
ZnSO <sub>4</sub>	47.51 ± 0.89	131.52 ± 3.10
MnSO <sub>4</sub>	40.76 ± 2.05	51.42 ± 1.44
BaCl <sub>2</sub>	11.29 ± 0.39	49.64 ± 1.60
CaCl <sub>2</sub>	57.70 ± 2.42	75.24 ± 2.50
NH <sub>4</sub> Cl	51.30 ± 0.54	29.92 ± 0.37
NaCl	88.86 ± 3.10	80.09 ± 1.75
MgSO <sub>4</sub>	44.91 ± 1.44	104.38 ± 2.69
Sodium citrate	92.18 ± 0.41	28.20 ± 1.96
MnCl <sub>2</sub>	47.27 ± 1.78	22.75 ± 1.23
HgCl <sub>2</sub>	93.36 ± 2.87	00.00 ± 0.00
Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	21.80 ± 0.74	00.00 ± 0.00

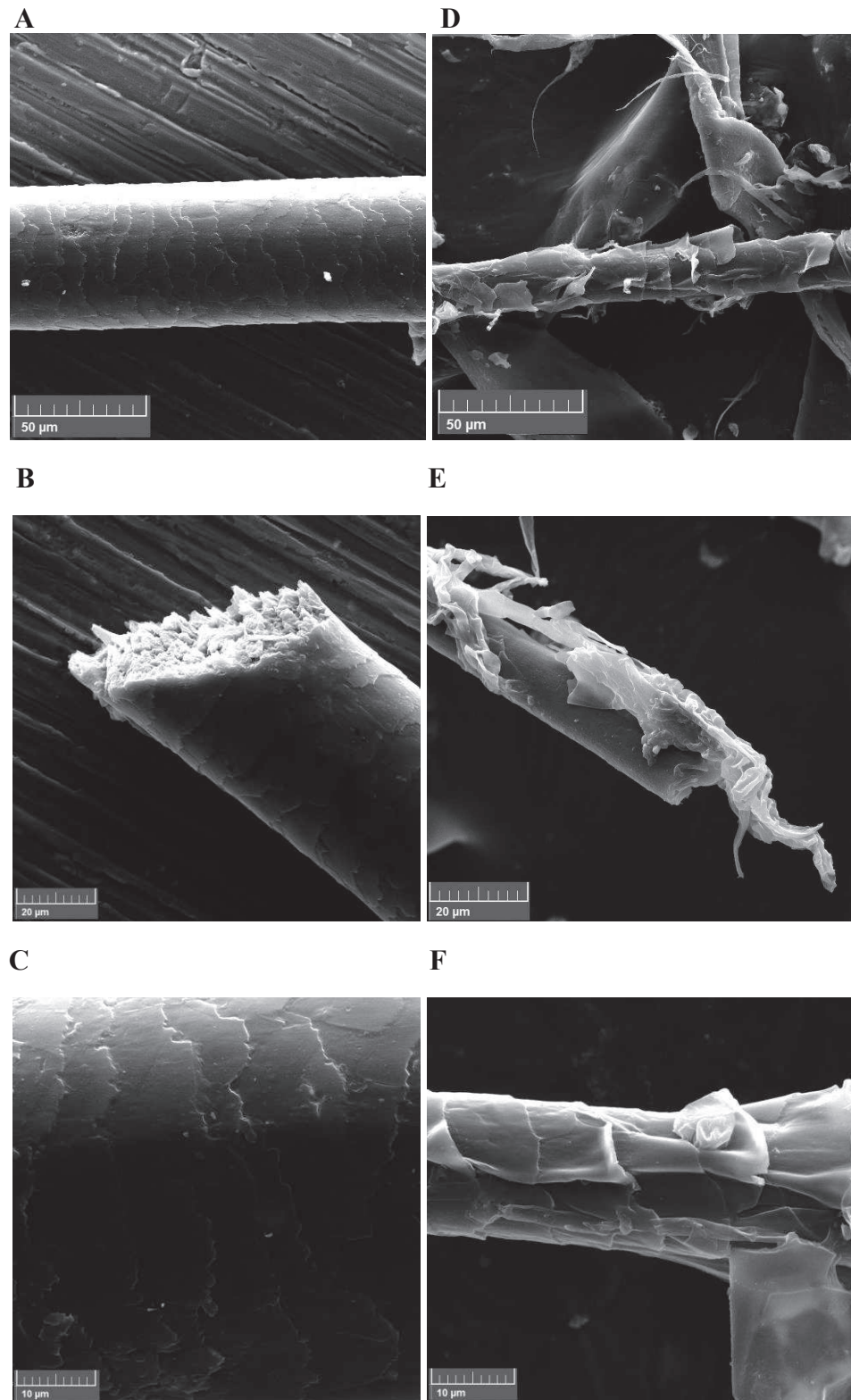
  

Substance	Final concentration	
	0,5%	1%
EDTA	29.15 ± 1.28	22.81 ± 0.37
β-mercaptoethanol	34.36 ± 1.85	49.17 ± 2.24
Methanol	17.06 ± 0.62	46.56 ± 0.62
Ethanol	15.64 ± 0.94	45.02 ± 1.03
Isopropanol	25.83 ± 0.82	36.85 ± 3.35
Tween 20	54.98 ± 1.60	33.41 ± 0.94
Tween 80	80.57 ± 2.62	71.80 ± 2.33
SDS	11.02 ± 0.62	6.34 ± 0.27

EDTA: disodium ethylenediaminetetracetate, SDS: sodium dodecylsulfate

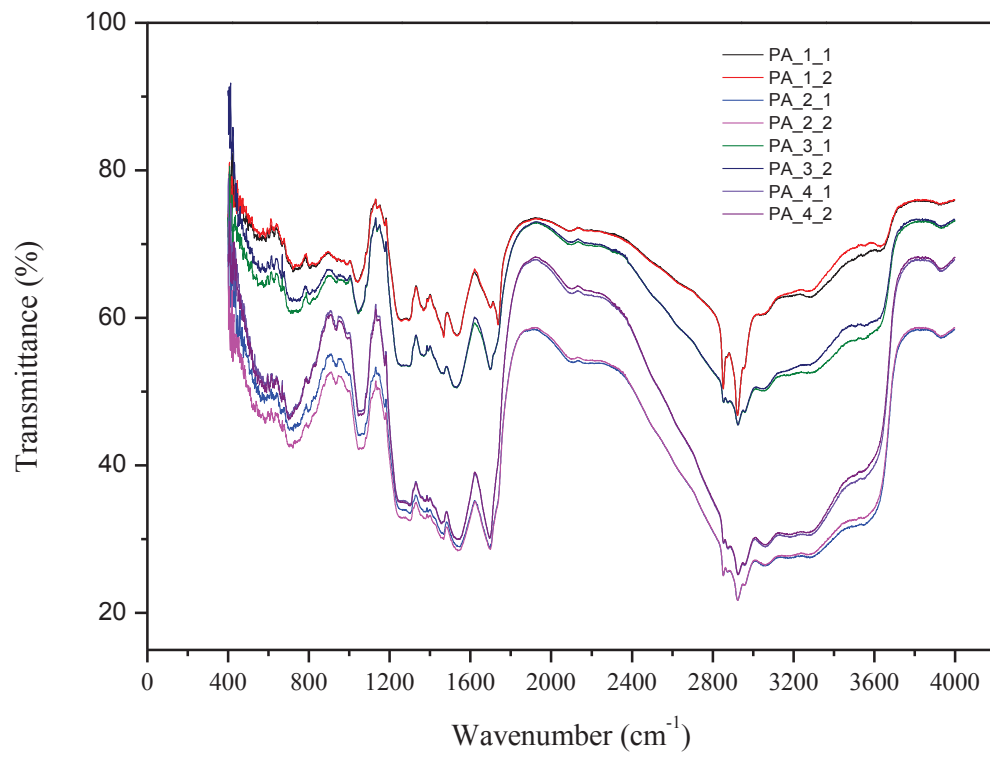


**Figure 1.** Fitted response-surface contour plots of central composite design for alkaline protease production by *E. oxysporum*. Figures shows the interaction cultivation time and substrate concentration (A), medium pH and substrate concentration (B) and medium pH and cultivation time (C).

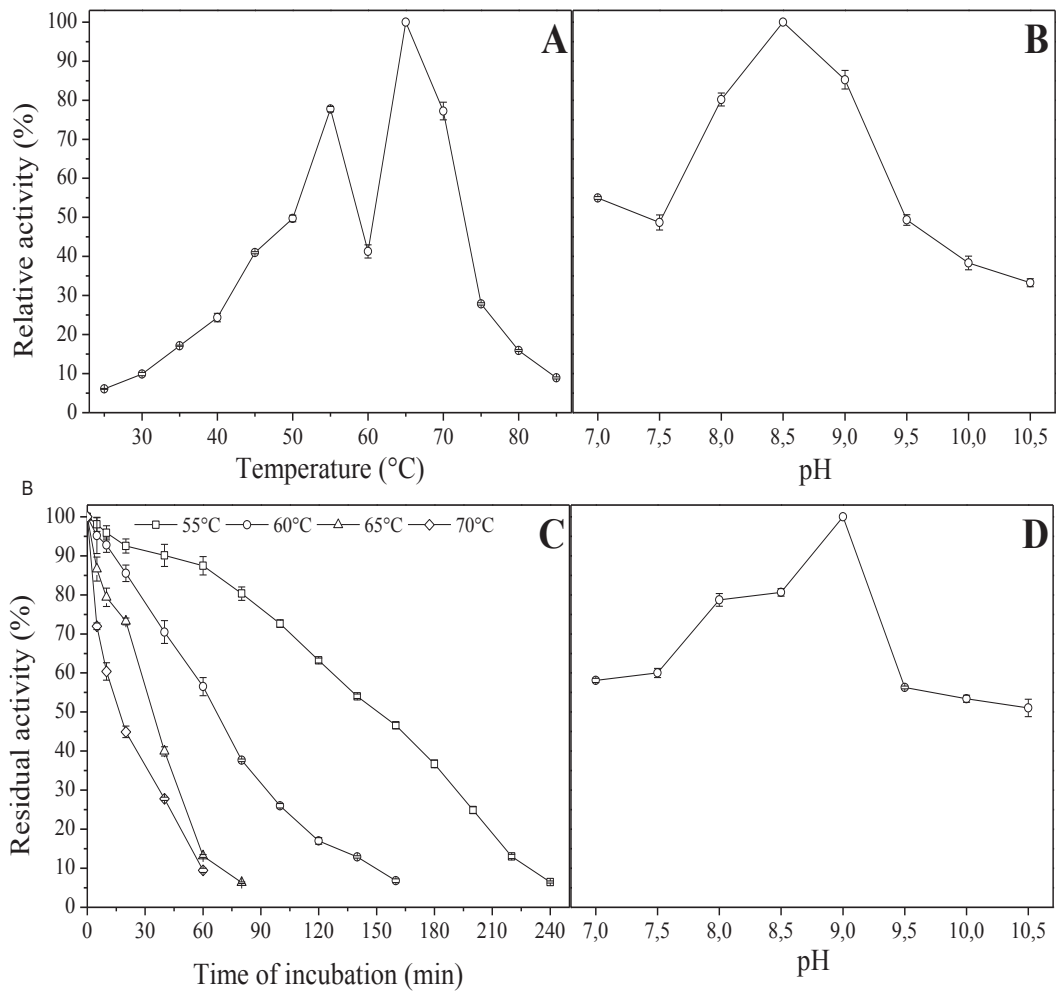


**Figure 2.** Scanning electron microscopy of dog hair. Figures A, B and C shows control hair, that was untreated and Figures D, E and F presents hair that was treated by *F. oxysporum* on submerged cultivation from 8.6 days. It can be seen the colonization of fungal on hair surface.





**Figure 3.** Infrared spectra grouped by means of FTIR, samples of black dog hair.



**Figure 4.** Influence of temperature (A) and pH (B) on alkaline protease activity from *F. oxysporum*. Plates C and D represent thermal and pH stability of this enzyme.

## 7. Considerações finais

Por meio dos estudos de bioprospecção de fungos isolados a partir de diferentes ambientes foi possível selecionar uma linhagem potencialmente produtora de proteases, capaz de produzir bons níveis de proteases alcalinas quando crescida em presença de pelo de cachorro. O DCCR e a MSR mostraram-se eficazes em estabelecer as condições ótimas para a produção dessas enzimas pelo fungo *F. oxysporum*, elevando-se consideravelmente os níveis de proteases produzidos.

As enzimas produzidas em diferentes colorações de pelo apresentaram propriedades físico-químicas distintas, sugerindo a existência de diferentes isoformas que, por sua vez, apresentaram particularidades interessantes, podendo ser empregadas em diferentes processos industriais, como nas indústrias do processamento do couro e de detergentes.

O presente estudo demonstra a viabilidade de utilização do pelo de cachorro como substrato alternativo para a produção de proteases microbianas. Por não apresentar valor comercial mas, ser um risco ao meio ambiente, o uso do pelo de cachorro nos processos de produção enzimática pode se tornar uma alternativa bastante promissora e interessante.

## 8. Referências

- ABIDI, F.; CHOBERT, J. M.; HAERTLE, T.; MARZOUKI, M. N. Purification and biochemical characterization of stable alkaline protease Prot-2 from *Botrytis cinerea*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2301-2310, 2011.
- ADINARAYANA, K.; ELLAIAH, P.; SRINIVASULU, B.; DEVI, R. B.; ADINARAYANA, G. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 11, p. 1565–1572, 2003.
- ADRIO, J. L.; DEMAÏN, A. L. Microbial Enzymes: Tools for Biotechnological Processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.
- AKCAN, N.; UYA, F. Production of extracellular alkaline protease from *Bacillus subtilis* RSKK96 with solid state fermentation. **EurAsian Journal of BioSciences**, v. 5, p. 64-72, 2011.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; OKADA, K.; PESSOA, I. H. F. ; MILANEZ, A. I. Detection of extracellular protease in *Mucor* species. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 22 p. 114-117, 2005.
- ALVES, M. H.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; PORTO, A. L. F.; MILANEZ, A. I. Screening of *Mucor* spp. for the production of amylase, lipase, polygalacturonase and protease. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 4, p. 225-230, 2002.
- ANITHA, T. S.; PALANIVELU, P. Purification and characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. **Protein Expression and Purification**, v 88, p. 214-220, 2013.
- APHA. Animal and Plant Health Agency. Online Newsletter October 9th 2014. Available from: <<https://www.gov.uk/government/organisations/animal-and-plant-health-agency>>. Accessed: January 05th 2015.
- BACH, E., SANT'ANNA, V.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; SEGALIN, J.; BRANDELLI, A. Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2455-2462, 2012.
- BACON, C. W., PORTER, J. K., NORRED, W.P., LESLIE, J. F. Production of fusaric acid by *Fusarium* Species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4039-4043, 1996.
- BARRET, A. J. Proteolytic Enzymes: aspartic and metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183, 1995.
- BARRET, A. J. Proteolytic Enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods in Enzymology**, v. 244, p. 1-15, 1994.
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; O'BRIEN, E.A. The MEROPS database as a proteases information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, p. 95-102, 2001.
- BEVENUTO, J. A. Z.; FIRMINO, A. C.; ROMAN, S. M. L.; WILCKEN, C. F.; CHIARARIA, G.; SILVA, T. T. S.; NOZAKI, D. N.; CHAGAS, H. A.; PAVANI, M. A.; FURTADO, E. L. Evaluation of production of extracellular enzymes by *Fusarium* species

- isolated from different host. **Summa Phytopathologica**, v. 39, 2013.
- BOM, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. Editora Interciência, 2008. 506 p.
- BOM, E. P. S.; PEREIRA JÚNIOR, N. **Tecnologia enzimática**. 1. ed. Rio de Janeiro: Diagramação Eletrônica Ricardo Monteiro, 1999.
- BOX, G. B. P.; WILSON, K. B. On experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**, v. 13, p. 1-45, 1951.
- BRAAKSMA, M.; SMILDE, A. K.; van der WERF, M. J.; PUNT, P. J. The effect of environmental conditions on extracellular protease activity in controlled fermentations of *Aspergillus niger*. **Microbiology**, v. 155, p. 3430-3439, 2009.
- BRADLEY, N. **The response surface methodology**. 2007, 84 f. Dissertação (Master of Science in Applied Mathematics & Computer Science) - Indiana University of South Bend, 2007.
- BRANDELLI, A.; DAROIT, D. J.; RIFFEL, A. Biochemical features of microbial keratinases and their production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1755-1750, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 306, de 7 de dezembro de 2004**. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/10d6dd00474597439fb6df3fbc4c6735/RDC+N%C2%BA+306,+DE+7+DE+DEZEMBRO+DE+2004.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 09 set. 2014.
- BRASIL. Lei nº 12.305, de 2 de agosto de 2010 Institui a Política Nacional de Resíduos Sólidos. **Diário oficial da união**, Brasília, 02 ago. 2010. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/112305.htm)>. Acesso em: 10 set. 2014.
- BRAVO, C. E. C. et al. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 24, n. 1, p. 137-152, 2000.
- BRUSH, A.H. On the origin of feathers. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 9, p. 131-142, 1996.
- BUENO, C. J.; CHAGAS, H. A.; BETTIOL, W.; FURTADO, E. L. Extracellular enzymes production by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* isolates from chrysanthemum. **Summa Phytopathologica**, v. 34, 2011.
- CARVALHO, A. et al. **Bioquímica da beleza: curso de verão 2005**. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo. 2005. 150p. Disponível em: <<http://www.iq.usp.br/bayardo/bioqbeleza/bioqbeleza.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2014.
- CAVELLO, I. C.; HOURS, R. A. ROJAS, N. L.; CAVALITTO, S. F. Purification and characterization of keratinolytic serine protease from *Purpureocillium lilacinum* LPS # 876. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 972-978. 2013.
- CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Boletim informativo on-line de

08/03/2013. Disponível em: < <http://www.cfmv.gov.br/portal/destaque.php?cod=1155>>. Acesso em: 16 set. 2014.

CFMV. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Resolução nº1.015 de 09 de janeiro de 2013. Conceitua e estabelece condições para o funcionamento de estabelecimentos médicos veterinários, e dá outras providências. Disponível em: < <http://www legisweb.com.br/legislacao/?id=250860>>. Acesso em: 16 set. 2014.

CHANALIA, P.; GANDHI, D.; JODHA, D.; SINGH, J. Applications of microbial proteases in pharmaceutical industry: na overview. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 22, p. 96-101, 2011.

CHUTMANOP, J.; CHUICHULCHERM S.; CHISTI, Y.; SRINOPHAKUN, P. Protease production by *Aspergillus oryzae* in solid-state fermentation using agroindustrial substrates. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 1012-1018, 2008.

CORADI, G. V. **Produção de lipase por *Fusarium oxysporum* em fermentação em estado sólido e sua aplicação em reações de síntese de ésteres de biodiesel**. 2012. 83 f. Dissertação - (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2012.

CRMV-MG. Conselho Regional de Medicina Veterinária de Minas Gerais. Boletim informativo, ano II, nº 7, maio de 2013. Disponível em: <<http://www.crmvmg.org.br/Boletim/juridico07.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2014.

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

DALMAGRO, J. **Associação de *Trichoderma* sp. e fungicidas no controle de *F. oxysporum* e f. sp. *phaseoli***. 2007, 78 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DAROIT, D. J.; BRANDELLI, A. A current assessment on the production of bacterial keratinases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 34, p. 372-384, 2014.

DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production of keratinolytic proteases through bioconversion of father meal by the Amazonian bacterium *Bacillus* sp. P45. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 45-51. 2011.

DENISOV, Y.; FREEMAN, S.; YARDEN, O. Inactivation of Snt2, a BAH/PHD-containing transcription factor, impairs pathogenicity and increases autophagosome abundance in *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 5, p. 449 – 461, 2011.

DEYDIER, E. et al. Physical and chemical characterization of crude meat and bone meal combustion residue: “waste or raw material?”. **Journal Hazard Materials**, v. 121, p. 141-148, 2005.

DRAELOS, Z.D. The biology of hair care. **Dermatologic Clinics**, v.18, n.4, p.651- 658, 2000.

ELLIS, M. B.; ELLIS, J. P. **Plurivorous fungi on herbaceous plants: microfungi on land plants: an identification handbook**. England: [s.n.], 1997. 293 p.

EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the

Council of October 3rd 2002. Available from: <[http://europa.eu/legislation\\_summaries/](http://europa.eu/legislation_summaries/)>. Accessed: January 05th 2015.

EVANS, K. L.; CROWDER, J.; MILLER, E. S. Subtilisins of *Bacillus* spp. hydrolyze keratin and allow growth on feathers. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 11, p. 1004–1011, 2000.

FARAG, A. M.; HASSAN, M. A. Purification, Characterization and immobilization of a keratinase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 34, p. 85-93, 2004.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, L. 2004. Enzimas como agentes biotecnológicos. In: SAID, S.R. & PIETRO, C.L.R. **Proteases: Características e aplicações industriais**. São Paulo: Editora Legis Summa. p. 327-339, 2004.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H. H. Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans*. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 40, p. 54-60, 2009.

FONSECA, J. C. L. **Manual para gerenciamento de resíduos perigosos**. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2009.

FRIEDRICH, J.; KERN, S. Hydrolysis of native proteins by keratinolytic protease of *Doratomyces microsporus*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 21, p. 35-37, 2003.

FUJINAGA, M.; CHERNEY, M. M.; OYAMA, H.; ODA, K.; JAMES, M. N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 10, p. 3364-3369, 2004.

GIONGO, J. L. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.** 2006, 95f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

GUPTA, R. K.; PRASAD, D.; SATHESH. J.; NAIDU, R. B.; KAMINI, N. R.; PALANIVEL, S.; GOWTHAMAN, M. K. Scale-up of an alkaline protease from *Bacillus pumilus* MTCC 7514 utilizing fish meal as a sole source of nutrients. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 9, p. 1230-1236, 2012.

GUPTA, R.; BEG, Q. K. Bacterid alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.59, p. 15-32, 2002.

HASSAN, M. A.; HAROUN, B. M.; AMARA, A. A.; SEROUR, E. A. production and characterization of keratinolytic protease from new wool-degrading *Bacillus* species isolated from Egyptian ecosystem. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-14, 2013.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, A. R.; GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, B. G.; BERGMANN, C. W.; LOERA-CORRALA, O.; ROJO-DOMÍNGUEZ, A.; HUERTA-OCHOA, S.; REGALADO-GONZÁLEZ, C.; PRADO-BARRAGÁ, L. A. Purification and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 2001–2006, 2011.

JEGANNATHAN, K. R.; NIELSEN, P. H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review. **Journal of Cleaner Production**, v. 42, p. 228-240.



2013.

JIMÉNEZ-CONTRERAS, E.; TORRES-SALINAS, D.; MORENO, R. B.; BAÑOS, R. R.; LÓPEZ-CÓZAR, E. D. Response Surface Methodology and its application in evaluating scientific activity. **Scientometrics**, v. 79, n. 1, p. 201-218, 2008.

JISHA, V. N.; SMITHA, R. B.; PRADEEP, S.; SREEDEVI, S.; UNII, K. N.; SAJITH, S.; PRIJI, P.; JOSH, M. S.; BENJAMIM, S. (2013). Versatility of microbial proteases. **Advances in Enzyme Research**, v. 1, p. 39-51, 2013.

JOHNVESLY, B.; NAIK, G. R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. **Process Biochemistry**, v. 37, p.139-144, 2001.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. 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.

KAJIURA, Y.; WATANABE, S.; ITOU, T.; NAKAMURA, K.; IIDA, A.; INOUE, K.; NYAGI, N.; SHINOHARA, Y.; AMEMIYA, Y. Structural analysis of human hair single fibers by scanning microbeam SAXS. **Journal of Structural Biomolecules**, v. 155, p. 438-444, 2006.

KATOH, K.; TANABE, T.; YAMAUCHI, K. Novel approach to fabricate keratin sponge scaffolds with controlled pore size and porosity. **Biomaterials**, v. 25, p. 4255-4262, 2004.

KAVANAGH, K. **Fungi - biology and applications**. 1. ed. Wiley, 2005. 280 p.

KERATIN, 2014. Hair biology. Disponível em: <<http://www.keratin.com/>>. Acesso em: 18 set. 2014.

KIM, J. D. Keratinolytic Activity of Five *Aspergillus* Species Isolated from Poultry Farming Soil in Korea. **Mycobiology**, v. 31, n.3, p. 157-161, 2003.

KÖHLER, R. C. O. **A Química da Estética Capilar como Temática no Ensino de Química e na Capacitação dos Profissionais da Beleza**. 2011, 113f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

KOHLI, A.; SINGH, H. Optimization of processing parameters in induction hardening using response surface methodology. **Indian Academy of Sciences**, v. 36, p. 141-152, 2011.

KOLE, M. M.; DRAPER, I.; GERSON, D. F. Production of protease by *Bacillus subtilis* using simultaneous control of glucose and ammonium concentrations. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 41, p. 196-206, 1998.

KONDO, M. Y. **Caracterização do mecanismo catalítico da SGP, enzima protótipo das glutâmico peptidases**. 2012, 122f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

KONDO, M. Y.; OKAMOTO, D. N.; SANTOS, J. A. N.; JULIANO, M. A.; ODA, K.; PILLAI, B.; JAMES, M. N. G.; JULIANO, L.; GOUVEA, I. E. Studies on the catalytic mechanism of a glutamic peptidase. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, v. 285, n. 28, p. 21437-21445, 2010.



KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial: view point. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 561-594, 1999.

LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; DELATORRE, A. B.; PEREZ, V. H.; MARTINS, M. L. L. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 324-328, 2010.

LEMANCEAU, P.; PETER A. H. M. BAKKER, P. A. H. M.; JAN DE KOGEL, W.; ALABOUVETITE, C.; SCHIPPERS, B. Antagonistic Effect of Nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudobactin* 358 upon Pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 74-82, 1993.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The *Fusarium* Laboratory Manual**. Oxford: Blackwell Publishing Professional, 2006. 388 p.

LI, Q.; YI, L.; MAREK, P.; IVERSON, B. L. Commercial proteases: present and future. **FEBS Letters**, v. 587, p. 1155-1163, 2013.

LI, S.; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, 2: e201209017, 2012.

MANIKANDAN, M.; KANNAN, V.; VELIKONJA, B. H.; PASIC, L. Optimization of growth medium for protease production by *Haloferax Lucentensis* VKMM 007 by response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 818-824, 2011.

MARCHISIO, V. F. Keratinophilic fungi: Their role in nature and degradation of keratinic substrates. In: KUSWAHA, R. K. S.; GUARRO, J (Eds.). **Biology of Dermatophytes and other Keratinophilic Fungi**. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología, 2000. cap.4. p. 86-92.

MARCONDES, N. R.; TAIRA, C. L.; VANDRESEN, D. C.; SVIDZINSKI, T. I. E.; KADOWAKI, M. K.; PERALTA, R. M. New Feather-Degrading Filamentous Fungi. **Microbial Ecology**, v. 56, p. 13-17, 2008.

MERSHALL, R. C.; ORWIN, D. F. G.; GILLESPIE, J. M. Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. **Electron Microscopy Reviews**, v.4, n.1, p.47-83, 1991.

MITSIADES, C. S.; MITSIADES, N.; HIDESHIMA, T.; RICHARDSON, P. G.; ANDERSON, K. C. Proteasome inhibition as a new therapeutic principle in hematological malignancies. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 10, p. 1341-1347, 2006.

MIYOSHI, S; SHINODA, S; Microbial metalloproteases e pathogenesis. **Microbes and Infection, Amsterdam**, v. 2, p. 91-98, 2000.

MONTGOMERY, D. C. Experimental design for product and process design and development. **The Statistician**, v. 48, p. 149-177, 1999.

MUHSIN, T. M.; AUBAID, A. H. Partial purification and some biochemical characteristics of exocellular keratinase from *Trichophyton mentagrophytes* var. *erinacei*. **Mycopathologia**, v. 150, p. 121-125, 2000.

MUHSIN, T. M.; HADI, R. B. Degradation of keratin substrates by fungi isolated from

sewage sludge. **Mycrobiologia**, v. 154, p.185-189, 2001.

MURI, E. M. F. Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptídeomiméticos. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 308-316, 2014.

MUTHULAKSHMI, C.; GOMATHI, D.; KUMAR, D. G.; RAVIKUMAR, G.; KALAISELVI, M.; UMA, C. Production, purification and characterization of protease by *Aspergillus flavus* under solid state fermentation. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 3, p. 137-148, 2011.

NAIDU, K. S. B.; DEVI, K. L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 7, p. 724-726, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. **Ciências Tecnologia e Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 417-421, 2007.

NELSON, P. E.; DIGNANI, M. C.; ANAISSIE, E. J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 4, p. 479-504, 1994.

NOVELINO, L.; NAPOLITANO, A.; PROTA, G. Isolation and characterization of mammalian eumelanins from hair and irides. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1475, p. 295-306, 2000.

OKAFOR, J. I.; NGWOGU, A. Keratinolytic activity of five human isolates of the dermatophytes. **Journal of Communicable Diseases**, v. 32, n. 4, p. 300-305, 2000.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F. Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia central, Amazonas, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 853-860, 2006.

ONIFADE, A.A.; AL-SANE, N. A.; AL-MUSALLAM, A. A.; AL-ZARBAN, S. A review: potentials for biotechnological applications of keratin-degrading microorganisms and their enzymes for nutritional improvement of feathers and other keratins as livestock feed resources. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 1-11, 1998.

ORLANDELLI, R. C.; SPECIAN, V.; FELBER, A. C.; PAMPHILE, J. A. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. **Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 3, p. 97-109, 2012.

PARANTHAMAN, R.; ALAGUSUNDARAM, K.; INDHUMANATHI, J. Production of protease from rice mill wastes by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **World Journal of Agricultural Sciences**, v. 5, n. 3, p. 308-312, 2009.

PARIMALA, T.; SNEHA, P.M.; RAO, C. S. V.; BABU, R. S. Response surface optimization of process variables for alkaline protease production by *Bacillus subtilis*. **Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 228-236. 2012.

POLITZER, K.; BON, E. P. S. **Enzimas Industriais e Especiais**. Rio de Janeiro: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos: Ciência, Tecnologia e Inovação, 2006. 580p.

RADHA, S.; NITHYA, V. J.; BABU, R. H.; SRIDEVI, A.; PRASAD, N.; NARASIMHA, G. Production and optimization of acid protease by *Aspergillus* spp under submerged

fermentation. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 2, p. 155-163, 2011.

RAGHUNATH, T.; BADGUIAR, S. B. Biological aspects of proteolytic enzymes: a review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, p. 2048-2068, 2010.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAO, S. C.; SATHISH, T.; RAVICHANDRA, P.; PRAKASHAM, R. S. Characterization of thermo- and detergent stable serine protease from isolated *Bacillus circulans* and evaluation of eco-friendly applications. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 262-268, 2009.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. T.; BATEMAN, A. Asparagine peptidase lyases: a seventh catalytic type of proteolytic enzymes. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 286, p. 38321-38328, 2011.

RIFFEL, A.; ORTOLAN, S.; BRANDELLI, A. De-hairing activity of extracellular proteases produced by keratinolytic bacteria. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, n. 8, p. 855-859, 2003.

ROBBINS, C. R. **Chemical and Physical Behavior of Human Hair**. 4 ed. New York: Springer-Verlag, 2002. 502 p.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SANCHEZ, S.; DEMAIN, A. L. Enzymes and bioconversions of industrial, pharmaceutical and biotechnological significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, p. 224-230, 2011.

SANDHYA, C.; SUMANTHA, A.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Comparative evaluation of neutral protease production by *Aspergillus oryzae* in submerged and solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40 p. 2689-2694, 2005.

SANKARESWARAN, M.; ANBALAGAN, S.; PRABHAVATH, P. Optimization of production of an extracellular alkaline protease by soil isolated *Bacillus* species using submerged and solid-state fermentation with agricultural wastes. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, p. 872-877, 2011.

SANTOS, A. S. R. **Biodiversidade, bioprospecção, conhecimento tradicional e o futuro da vida**. Disponível em: < <http://www.ccuac.unicamp.br/revista/infotec/artigos/silveira.html>>. Acesso em: 13 out. 2014.

SANTOS, T. A. O. **Peptidases e lipases produzidas pelo fungo *Fusarium oxysporum*: caracterização e microencapsulação por spray drying**. 2012, 85f. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SAVITHA, S.; SADHASIVAN, S.; SWAMINATHAN, K.; LIN, F. H. Fungal protease: production, purification and compatibility with laundry detergents and their wash performance. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 42, p. 298-304, 2011.

SCHROOYEN, P. M.; DIJKSTRA, P. J.; OBERTHÜR, R. C.; BANTJES, A.; FEIJEN, J. Partially carboxymethylated feather keratins. 1. Properties in aqueous systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4.326-34, 2000.

SHANKAR, S.; RAO, M.; LAXMAN, R. S. Purification and characterization of an alkaline protease by a new strain of *Beauveria* sp. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 579-585. 2011.

SHANKAR, T.; RAMA, R.; THANGAMATHI, P.; SIVAKUMAR, T. Keratinase production by *Bacillus megaterium* RS1 using the statistical tool central composite design. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 48, p. 6776-6784. 2013.

SHU, Z. Y.; JIANG, H.; LIN, R. F.; JIANG, Y. M.; LIN, L.; HUANG, J. Z. Technical methods to improve yield, activity and stability in the development of microbial lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 1-8, 2010.

SHUMI, W.; HOSSAIN, T.; ANWAR, M. N. Isolation and purification of fungus *Aspergillus funiculosus* G. Smith and its enzyme protease. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, n. 7, v. 3, p. 312-317, 2004.

SIALA, R.; FRIKHA, F.; MHAMDI, S.; NASRI, M; KAMOUN, A. S. Optimization of acid protease production by *Aspergillus niger* L1 on shrimp peptone using statistical experimental design. **The Scientific World Journal**, v. 2012 , p. 11, 2012.

SILVA, R.; FRANCO, C. M. L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 2, p. 249-260, 1997.

SOARES, I. A. et al. Identification of the amyolytic potential of mutant strains of the filamentous fungi *Aspergillus nidulans*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 3, p. 700-705, 2010.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. 2. ed. London: Elsevier Science, 1995. 357 p.

SUZUKI, Y. et al. Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, p. 73-81, 2006.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 90, p. 1-11. 2013.

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

TREMACOLDI, C. R.; CARMONA, E. C. Production of extracellular alkaline proteases by *Aspergillus clavatus*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 169–172. 2005.

VARELA, H.; FERRARI, M. D.; BELOBRADJIC, L.; WEYRAUCH, R.; LOPERENA, M. L. Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhearing activity. **World Journal Microbiology Biotechnology**, n.12, p.643-645, 1996.

VÁZQUEZ, I. R., AGUILERA, A. F.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; AGUILAR, C. N. Producción Fúngica de Proteasas Inducidas con Pelo de Cerdo. **Información Tecnológica**, v. 19, n. 2, p. 33-40, 2008.

VETINFO. **Dog Fur and Dog Hair** - What's the Difference? Disponível em: <<http://www.vetinfo.com/dog-fur-hair-difference.html>>. Acesso em: 17 set. 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for (medium N). **Microbial genetics bulletin**, v. 13, p. 42-43. 1956.

WAGNER, R. C. C. **A estrutura da medula e sua influência nas propriedades mecânicas e de cor do cabelo**. 2006, 95f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. Aspectos da produção industrial de enzimas. **Revista CITINO**, v. 1, n. 1, p. 30-36, 2011.

WANG, J.; MALDONADO, M. A. The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 3, n. 4, p. 255-261, 2006.

WILLIAMS, C. M.; RICHTER, C. S.; MACKENZIE-JR, J. M.; SHIH, J. C. H. Isolation, identification and characterization of a featherdegrading Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1509-1515, 1990.

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