



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Suellen Emilliany Feitosa Machado

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ISOLADOS NO SEMIÁRIDO
DA PARAÍBA E NA ANTÁRTIDA**

Campina Grande, PB

Março-2015

Suellen Emilliany Feitosa Machado

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ISOLADOS NO SEMIÁRIDO
DA PARAÍBA E NA ANTÁRTIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Linha de Pesquisa: Obtenção e Avaliação da Atividade Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos de Interesse Farmacêutico

Área de Concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Angela Fautino Jozala

Campina Grande/PB,

Março-2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

M149p Machado, Suellen Emilliany Feitosa.

Produção de Proteases por fungos isolados no Semiárido da Paraíba e na Antártida [manuscrito] / Suellen Emilliany Feitosa Machado. - 2015.

114 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Harley da Silva Alves, Departamento de Farmácia".

"Co-Orientação: Profa. Dra. Angela Fautino Jozala, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Enzimas proteolíticas. 2. Fungos do solo. 3. *Aspergillus tubingensis*. 4. *Rhodotorula mucilaginosa*. 5. Biorreator. I.

Título.

21. ed. CDD 579.5

Suellen Emilliany Feitosa Machado

**PRODUÇÃO DE PROTEASES POR FUNGOS ISOLADOS NO SEMIÁRIDO
DA PARAÍBA E NA ANTÁRTIDA**

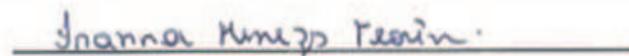
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 02 de março de 2015.

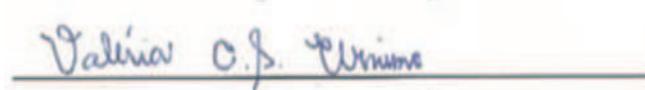
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Harley da Silva Alves
Orientador



Dr^a. Isanna Meneses Florêncio
Membro Interno



Prof^a. Dr^a. Valéria De Carvalho S. Ebinuma
Membro Externo

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

REITOR

Prof. Dr. Antonio Guedes Rangel Júnior

VICE-REITOR

Prof. Dr. José Ethan de Lucena Barbosa

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Prof.^a Dr.^a Maria José Lima da Silva

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof.^a Dr.^a Dilma Maria de Brito Melo Trovão

VICE-DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno

Aos meus pais, **Sávio e Rosália**, por nunca medirem
esforços para a realização dos meus sonhos.

Ao meu irmão, **Samuel**, por todo amor e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte inesgotável de perseverança e sabedoria, por sempre me amparar e não me deixar desistir quando os obstáculos pareciam invencíveis.

À minha família, pelo amor imensurável, que foi meu maior incentivo para conquistar essa vitória. Gratidão!

Ao meu orientador, Professor Doutor Harley da Silva Alves, pela confiança e por todos os ensinamentos transmitidos.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Angela Faustino Jozala, pela acolhida, paciência, amizade e por me ajudar durante a realização da pesquisa.

À Professora Valéria Ebinuma e à Doutora Isanna Menezes, por aceitarem participar da banca avaliadora.

Ao Professor Doutor Adalberto Pessoa Júnior, por abrir as portas do Laboratório de Biotecnologia Bioquímico-Farmacêutica (LabiTec) da USP para execução da pesquisa e pelas constantes orientações.

A Valker Feitosa, pela paciência, disponibilidade e companheirismo sempre constantes. Obrigada por poder contar com você!

À Luciana Lario, por toda a ajuda e orientação, bem como pelas conversas construtivas.

A todos os meus amigos e funcionários do LaBioTec, pela acolhida e companheirismo sempre presentes.

A Paulo Victor, pelo amor, paciência, compreensão e incentivo.

À minha família paulista (Tio Neto, Tia Vera e Juliane) pelo amparo durante a minha estadia em São Paulo. Devo parte dessa vitória a vocês!

A todos os meus amigos, que contribuíram de forma direta ou indireta nesta conquista e que torcem verdadeiramente pelo meu sucesso.

À Universidade Estadual da Paraíba e à Universidade de São Paulo, por serem as sedes da realização deste trabalho.

À CAPES e ao PROCAD, pelo apoio financeiro.

*“Agir, eis a inteligência verdadeira. Serei o que
quiser. Mas tenho que querer o que for. O êxito está
em ter êxito, e não em ter condições de êxito.
Condições de palácio tem qualquer terra larga, mas
onde estará o palácio se não o fizerem ali?”*

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras	VI
Lista de Tabelas	VIII
Lista de Quadros	IX
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	X
Resumo	11
Abstract	12
Capítulo 1 – Revisão de Literatura	13
Resumo	14
1. Introdução	15
2. Material e métodos	19
3. Resultados e discussão	19
4. Conclusão	25
Referências bibliográficas	26
Capítulo 2 - Fungos filamentosos do semiárido paraibano	30
Resumo	31
1. Introdução	32
2. Material e métodos	34
2.1 Coleta e isolamento dos microrganismos	34
2.2 Cultivo em agitador rotatório	35
2.3 <i>Screening</i> para atividade proteolítica (qualitativa)	36
2.4 Quantificação da atividade proteolítica	37
2.5 Determinação da biomassa	38
2.6 Identificação dos microrganismos	38
2.6.1 Microcultivo em lâmina	38
2.6.2 Identificação da espécie melhor produtora de proteases	40
2.6.3 Avaliação do potencial de produção de fumonisina B2 (FB2) pela espécie melhor produtora de proteases	40
2.6.3.1 Detecção de FB2 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência	41
2.6.4 Avaliação do potencial de produção de de ocratoxina A (OTA) pela espécie melhor produtora de proteases	41
3. Resultados	42
3.1 <i>Screening</i> para atividade protease (qualitativa)	42
3.2 Quantificação da atividade proteolítica total e determinação da biomassa	44
3.3 Identificação dos microrganismos	46
3.3.1 Identificação da amostra Fung1	46
4. Discussão	49
5. Agradecimentos	55
Referências bibliográficas	55

Nota de esclarecimento	62
Capítulo 3 - Levedura da Antártida	63
Resumo	64
1. Introdução	65
2. Revisão de Literatura	67
2.1 Processos biotecnológicos industriais	67
2.1.1 Biorreatores	68
2.1.2 Fornecimento de oxigênio como fator limitante	71
2.2 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	73
2.2.1 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L07	74
3. Objetivos	77
3.1 Objetivo Geral	77
3.2 Objetivos Específicos	77
4. Material e Métodos	78
4.1 Local da pesquisa	78
4.2 Microrganismo	78
4.2.1 Construção do banco de trabalho	78
4.3 Meio de cultivo	78
4.4 Preparo do inóculo	79
4.5 Condições de cultivo	79
4.5.1 Descrição do biorreator	79
4.5.2 Preparo do biorreator e do meio de cultivo	81
4.5.3 Condições dos cultivos	81
4.5.4 Calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido	82
4.5.5 Calibração do eletrodo de pH	83
4.5.6 Determinação do coeficiente volumérico de transferência de oxigênio (K_{La})	83
4.6 Metodologias analíticas	84
4.6.1 Quantificação da biomassa	84
4.6.2 Quantificação da atividade proteolítica	85
4.6.3 Dosagem de proteínas totais	85
4.6.4 Dosagem de glicose	86
4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos	87
5. Resultados e discussão	89
5.6 Resultados experimentais em biorreator	89
5.6.1 Cálculo do K_{La}	90
5.6.2 Quantificações analíticas	91
6. Conclusão	103
Referências bibliográficas	104

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease.....15
- Figura 2.** Etapas da busca sistemática e seleção dos artigos.....20

Capítulo 2

- Figura 1.** Local da coleta das amostras superficiais das raízes, dos caules, das folhas e dos frutos de coqueiros e do solo do coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, PB, Brasil.....35
- Figura 2.** Cultivo dos fungos em agitador rotatório a 200 rpm, a 30 °C ± 0,5, durante 72 horas.....36
- Figura 3.** Representação esquemática da instrumentação necessária para realização da técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddel, 1950..... 39
- Figura 4.** Etapas da técnica de microcultivo em lâmina.....39
- Figura 5.** Distribuição dos fungos filamentosos obtidos através da coleta de amostras de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil.....43
- Figura 6.** Estruturas macroscópicas do fungo Fung1, isolado de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil.....44
- Figura 7.** Atividade proteolítica, biomassa e pH do Fung1, em cultivo realizado durante 240 h, a 200 rpm e 30 °C ± 0,5.....45
- Figura 8.** Fungos isolados em um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil, agrupados de acordo com seus gêneros.....46
- Figura 9.** Aspecto microscópicos do isolado Fung1. A) Conidióforo característico do gênero *Aspergillus*; B) Conídios.....47
- Figura 10.** Árvore filogenética das sequências das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do Fung1 e de sequências próximas recuperadas no GenBank. *Aspergillus robustus* NRRL 6362 foi utilizado como *outgroup*.....48
- Figura 11.** Árvore filogenética das sequências de Calmodulina do Fung1 e de sequências próximas recuperadas no GenBank. *Aspergillus robustus* NRRL 6362 foi utilizado como *outgroup*.....48

Capítulo 3

- Figura 1.** Tipos de biorreatores utilizados em bioprocessos. a) Biorreator de Tanque Agitado e b) Biorreator *airlift*.....70
- Figura 2.** Resistências associadas ao transporte do oxigênio de uma bolha de ar para o interior de uma célula microbiana.....72
- Figura 3.** Colônias da levedura *R. mucilaginosa* L07 em ágar Sabouraud, após 72 horas de incubação a 25 °C.....76
- Figura 4.** Representação do biorreator New Brunswick Scientific Bioflo. **A)** Vista superior; **B)** Vista lateral com manta de aquecimento; **C)** Vista lateral sem manta de aquecimento (NEW BRUNSWICK, 2002).....80
- Figura 5.** Foto do Biorreator New Brunswick Bioflo usado neste trabalho.....81
- Figura 6.** Curva padrão de proteínas totais.....86
- Figura 7.** Curva padrão de glicose.....87
- Figura 8.** Atividade proteolítica da *R. mucilaginosa* L07 em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C / 150 rpm / 120 h.....89
- Figura 9.** Representação das curvas biomassa, glicose, proteínas totais, pH e produção de proteases de cultivos de *R. mucilaginosa* L07 em biorreator. A1 e A2) Agitação: 100 rpm e aeração: 1,0 vvm; B1 e B2) Agitação: 300 rpm e aeração: 1,0 vvm; C1 e C2) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,0 vvm; D1 e D2) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,5 vvm; E1 e E2) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,0 vvm; F1 e F2) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,5 vvm.....91
- Figura 10.** Ilustração dos meios de cultura oriundos dos 6 cultivos da levedura *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator durante 72 horas. 1) Agitação: 100 rpm e aeração: 1,0 vvm; 2) Agitação: 300 rpm e aeração: 1,0 vvm; 3) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,0 vvm; 4) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,5 vvm; 5) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,0 vvm; 6) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,5 vvm.....94
- Figura 11.** Atividades proteolíticas dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 em biorreator.....96
- Figura 12.** Ilustração dos valores das produtividades em produto dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 dispostas em curvas.....99

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1. Avaliação da formação de halos indicativos da produção de proteases em meio sólido contendo *skim Milk* a 10%, utilizando extratos fúngicos de 32 fungos isolados nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil.....**43**

Tabela 2. Valores da atividade proteolítica, da biomassa e do pH dos extratos do Fung1, obtidos após o cultivo de 240 horas realizado em agitador rotatório a 200 rpm e 30 °C ± 0,5.....**44**

Capítulo 3

Tabela 1. Resultados experimentais do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).....**90**

Tabela 2. Valores finais (t=72 h) dos parâmetros biomassa, glicose, proteínas totais, pH e atividade proteolítica dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator.....**91**

Tabela 3. Valores das produtividades em produto dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator, com duração de 72 horas.....**98**

Tabela 4. Valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ e $Y_{x/s}$ dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator.....**95**

LISTA DE QUADROS

Capítulo 1

Quadro 1. Dados relativos aos cultivos para obtenção das enzimas.....**20**

Quadro 2. Dados relacionados às proteases obtidas após o cultivo dos microrganismos.....**22**

Capítulo 3

Quadro 1. Composição do Caldo Sabouraud (informação fornecida pelo fabricante - DIFCO).....**79**

Quadro 2. Valores de agitação e aeração dos cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator.....**82**

Quadro 3. Condições pré-estabelecidas de cultivo da levedura *R. mucilaginosa* L07 em biorreator.....**82**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%: Porcentagem

°C: Graus Celsius

BCA: Ácido Bicincôninico

BSA: Albumina de soro bovino

C: Concentração de oxigênio dissolvido

C*: Concentração de saturação de oxigênio dissolvido

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

g: Gramas

g.L⁻¹: Gramas por Litro

KOH: Hidróxido de Potássio

K_{La}: Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

M: Molar

mg: Miligrama

mL: Mililitro

m/v: Massa por volume

nm: Nanômetro (s)

OTA: Ocratoxina A

PDA: Potato Dextrose Agar

P₀: Atividade proteolítica inicial

P_f: Atividade proteolítica final

pH: Potencial hidrogeniônico

Prod_p: Produtividade em produto (proteases)

PBS: Tampão fosfato salino

p/v: Peso por volume

q.s.p.: Quantidade suficiente para

rpm: Rotações por minuto

S₀: Concentração inicial de substrato (glicose)

S_f: Concentração final de substrato (glicose)

t: Tempo (h)

t₀: Tempo inicial

t_{FP}: Tempo de cultivo correspondente a P_f

TCA: Ácido Tricloroacético

U: Unidade de atividade enzimática

U.mL⁻¹: Unidade de atividade enzimática por mililitro

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

V/V: Volume por volume

vvm: Volume de ar por volume de meio por minuto

X: Concentração celular ou biomassa

X*: Concentração celular ao longo da fase exponencial

X_{máx}: Concentração celular máxima

X₀: Concentração celular inicial

Y_{x/s}: Fator global de conversão de substrato (glicose) a células

μL: Microlitro

μ_{máx}: Velocidade máxima de crescimento

θ: Tempo.

RESUMO

MACHADO, S.E.F. **Produção de proteases por fungos isolados no semiárido da Paraíba e na Antártida.** 2015. 116f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2015.

Proteases são constituintes essenciais em todos os seres vivos, pois estão envolvidas em processos biológicos essenciais como coagulação sanguínea, morte celular, diferenciação de tecidos, transporte de proteínas através da membrana etc. Também possuem importante aplicabilidade biotecnológica, pois podem ser usadas no processamento de alimentos, formulação de detergentes, processamento de couro, amaciamento de carnes, formulação de medicamentos, na indústria têxtil etc. Por representarem aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas industriais, são consideradas um importante grupo de enzimas. Este trabalho foi dividido em duas etapas e objetivou isolar fungos filamentosos coletados em coqueiros e solo de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil e fazer um *screening* quanto à produção de proteases, além de avaliar, em biorreator, a produção de proteases pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07. Ao todo, 32 fungos foram isolados no semiárido paraibano, cultivados em agitador rotatório e encaminhados à análise da atividade proteolítica. A espécie inicialmente denominada Fung1 apresentou melhor resultado na etapa qualitativa, foi encaminhada à identificação molecular e selecionada para a produção em agitador rotatório (30°C/ 200rpm/ 240h). A *R. mucilaginosa* L07, coletada na Antártida, foi cultivada em biorreator (25°C/ 72h), variando agitação e aeração. A atividade enzimática máxima do Fung1, identificado como *Aspergillus tubingensis*, foi 29 U.mL⁻¹, após 144h de cultivo. Este fungo não é produtor de fumonisina B2 e ocratoxina A. O maior valor de atividade proteolítica da *R. mucilaginosa* L07 foi de 124,88 U.mL⁻¹, com agitação de 500rpm e aeração de 1,0vvm. Os resultados indicaram que *A. tubingensis* produz proteases, porém outros estudos são necessários para otimizar a produção e classificar as proteases. O fornecimento de oxigênio em cultivos da *R. mucilaginosa* L07 foi positivo para a atividade proteolítica, pois a mesma aumentou de 33,36 para 124,88 U.mL⁻¹, em agitador rotatório e biorreator, respectivamente.

Palavras-chave: Enzimas proteolíticas. Fungos do solo. *Aspergillus tubingensis*. *Rhodotorula mucilaginosa*. Biorreator.

ABSTRACT

MACHADO, S.E.F. **Protease production by fungi isolated in the semiarid region of Paraíba and Antarctica.** 2015. 116f. Dissertation (Master). State University of Paraíba, Campina Grande, in 2015.

Proteases are essential constituents of all living beings, since they are involved in essential biological processes such as blood clotting, cell death, tissue differentiation, protein transport across the membrane etc. They also have important biotechnological applicability, because they can be used in food processing, manufacture of detergents, leather processing, meat softening, drug formulation, in the textile industry etc. These enzymes represents about 60% of the global market for industrial enzymes; so, they are considered an important group of enzymes. This work was divided into two stages and aimed to isolate filamentous fungi collected from coconut trees and soil from a coconut located in Varzeas de Sousa, Paraíba, Brazil and do a screening for the production of proteases and to evaluate, in a bioreactor, the production of proteases by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* L07. In all, 32 fungi were isolated in Paraíba semiarid. They were grown in rotary shaker and sent to the analysis of proteolytic activity. The specie, originally called Fung1, showed better results in the qualitative stage and was taken to the molecular identification and selected for production in rotary shaker (30°C / 200rpm / 240h). *R. mucilaginosa* L07, originally from Antarctica, was cultivated in a bioreactor (25°C / 72h), varying agitation and aeration. The maximum enzyme activity by the Fung1, identified as *Aspergillus tubingensis*, was 29 U.mL⁻¹, after 144h cultivation. This fungus is not a fumonisin B2 and ochratoxin A producer. The greatest value of proteolytic activity of *R. mucilaginosa* L07 was 124.88 U.mL⁻¹ with agitation of 500rpm and aeration 1,0vvm. The results indicated that *A. tubingensis* produces proteases, but other studies are needed to optimize production and classify proteases. The supply of oxygen to *R. mucilaginosa* L07 were positive for proteolytic activity, because it increased from 33.36 to 124.88 U.mL⁻¹ in rotary shaker and bioreactor, respectively.

Keywords: Proteolytic enzymes. Soil fungi. *Aspergillus tubingensis*. *Rhodotorula mucilaginosa*. Bioreactor.

Capítulo 1:
Revisão de Literatura

Artigo a ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology*, formatado segundo as normas do periódico.

(ISSN: 1678-4405 / Qualis para Farmácia: B2 / Fator de Impacto (2011): 0,896)

PROTEASES MICROBIANAS E SUAS APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS

Suellen Emilliany Feitosa Machado¹; Harley da Silva Alves¹

¹ Departamento de Farmácia; Universidade Estadual da Paraíba.

Resumo:

Proteases representam uma classe de enzimas de interesse comercial significativo, pois possuem aplicações nas indústrias de fármacos, do couro, de alimentos e no processamento de resíduos, dentre outras utilidades. São produzidas por todos os organismos, porém os microrganismos são a fonte preferida destas enzimas para fins industriais. Sabendo que o estudo das aplicações industriais de proteases é um campo de investigação estimulante e lucrativo, a procura por novos microrganismos produtores destas enzimas tornou-se um processo contínuo; portanto, novas descobertas são esperadas. Esta revisão teve por objetivo associar informações relacionadas à produção de proteases por microrganismos de aplicação biotecnológica, abordando características gerais do cultivo e das proteases obtidas em tais estudos, a partir de uma revisão de literatura. Foi realizada uma busca eletrônica de publicações na base de dados PubMed, utilizando-se as seguintes palavras-chave: proteases, microrganismos e biotecnologia. Todos os artigos encontrados foram avaliados. Considerando os limites de inclusão e exclusão, foram selecionados os 10 estudos mais relevantes sobre o tema. Devido às inúmeras aplicações, o uso de proteases com ação biotecnológica está aumentando progressivamente, o que justifica uma maior necessidade de se buscar novas fontes de obtenção. Os microrganismos representam, neste contexto, um alvo economicamente viável, pois crescem facilmente e são geneticamente manipuláveis.

Palavras-chave: enzimas proteolíticas; biotecnologia; microrganismos industriais.

1. INTRODUÇÃO

As proteases podem ser definidas como enzimas que catalisam a clivagem de ligações hidrolíticas dentro das proteínas, liberando peptídeos e/ou aminoácidos (Theron e Divol, 2014), como é ilustrado na Figura 1. Os mesmos autores acrescentam que, geralmente, o termo “proteases” pode ser usado de forma intercambiável com os termos “proteinases” e/ou enzimas proteolíticas, mas o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) e da Comissão de Enzimas (CE) recomendam que o termo “peptidases” seja usado para todas as enzimas que clivam ligações peptídicas. Entretanto, as proteases não obedecem facilmente ao sistema geral de nomenclatura de enzimas, pois a diversidade de ação e estrutura deste grupo são enormes.

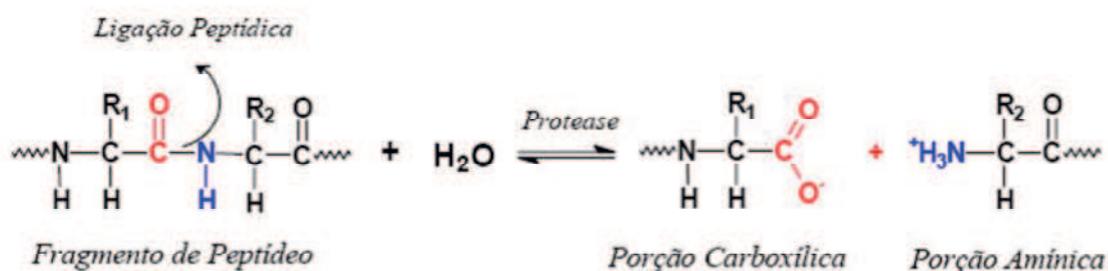


Figura 1. Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease (Fonte: Adaptado de Silva, 2011)

Na nomenclatura internacional de classificação de enzimas (EC), as proteases pertencem à classe 3, as hidrolases, e à subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Constituem uma grande família, dividida em endopeptidases (ou proteinases) e exopeptidases, de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia de peptídeos. As exopeptidases catalisam a quebra das ligações peptídicas próximas ao grupo amino-terminal ou carboxi-terminal do substrato; assim, podem ser denominadas de aminopeptidases e carboxipeptidases, respectivamente. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas das cadeias polipeptídicas e são classificadas de acordo com o seu tamanho molecular, carga, especificidade de substrato, mecanismo catalítico, estruturas tridimensionais e resíduos de

aminoácidos presentes no seu sítio catalítico. Assim, são subdivididas com base em suas especificidades, de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em: serina proteases, cisteína proteases, aspártico-proteases ou aspártico-endopeptidases e metaloproteases ou metaloendopeptidases. Industrialmente, as endopeptidases são mais importantes do que as exopeptidases (Rao et al., 1998; Grupta et al., 2002; Sumantha et al., 2006; Kasana et al., 2011; Muri, 2014; Theron e Divol, 2014).

Por fim, as proteases também se classificam com relação à faixa de pH em que suas atividades são ótimas. Proteases alcalinas e neutras são amplamente utilizadas na indústria, sendo adicionadas aos detergentes de uso doméstico, por exemplo. Já as proteases ácidas possuem uma grande quantidade de aplicações industriais, como na fabricação de queijos (Rao et al, 1998; Theron e Divol, 2014).

A grande diversidade de proteases, em contraste com a especificidade de suas ações, tem atraído a atenção mundial na tentativa de explorar suas aplicações fisiológicas e biotecnológicas, pois ocupam uma posição central no que diz respeito às suas aplicações em ambos os campos (Fox et al., 1991; Rao et al, 1998; Kuddus e Ramteke, 2012). Nesse contexto, Kasana et al. (2011) acrescentam que as proteases são usadas nas indústrias de alimentos e detergentes há muito tempo, mas a sua aplicação na indústria de couros e no tratamento de resíduos orgânicos é uma área relativamente nova. Na indústria de detergentes, são frequentemente empregadas por causa da ineficiência de detergentes não-enzimáticos em remover as proteínas de fibras têxteis. Assim, suas demais aplicações encontram-se distribuídas na indústria farmacêutica, de produtos laticínios, na panificação, na fabricação de produtos de soja, entre outras.

No geral, o mercado mundial de enzimas industriais arrecadou cerca de 3,6 bilhões de dólares em 2010 e estima-se que esse valor pode subir para 6 bilhões de dólares até 2016, crescendo a uma taxa de crescimento anual composta de 9,1% (Mokashe et al., 2015). As enzimas proteolíticas constituem um dos três maiores grupos de enzimas industriais e representam cerca de 60% da venda total mundial de enzimas (Rao et al, 1998; Kuddus e Ramteke, 2012).

Tais enzimas são fisiologicamente necessárias para os organismos vivos e, portanto, são ubíquas, sendo encontradas em uma ampla diversidade de

fontes como plantas, animais e microrganismos. A incapacidade das proteases vegetais e animais atenderem às demandas do mundo atual tem levado a um aumento do interesse nas proteases microbianas (Rao et al., 1998; Kuddus e Ramteke, 2012). Mundialmente, os microrganismos são responsáveis por uma quota de dois terços da produção de proteases (Kumar e Takagi, 1999; Kuddus e Ramteke, 2012). Proteases microbianas podem ser extra ou intracelulares e a sua produção é muito influenciada pelo microrganismo e por fatores nutricionais e físico-químicos como temperatura, pH, fontes de carbono e nitrogênio, sais inorgânicos, agitação e concentração de oxigênio dissolvido, além do tempo de incubação (Kasana et al., 2011; Kuddus e Ramteke, 2012).

Mukhtar e Haq (2012) afirmam que tanto os fungos como as bactérias são utilizados na obtenção de enzimas proteolíticas, mas a escolha do microrganismo depende da aplicação da enzima produzida. Na indústria alimentar, são utilizadas proteases ácidas e neutras, as quais são produzidas, principalmente, por fungos. Por exemplo, as proteases produzidas pelo *Aspergillus oryzae* são aplicadas na quebra das proteínas insolúveis da farinha de trigo, garantindo melhor solubilidade e redução no tempo de preparo da massa de pão (Rao et al., 1998). Já as indústrias de couro ou de detergentes requerem a utilização de proteases alcalinas, as quais são produzidas, principalmente, por bactérias. Uma grande proporção das proteases alcalinas disponíveis comercialmente é derivada de cepas do gênero *Bacillus* sp. (Joo et al., 2003).

Além das aplicações citadas, as proteases em geral têm propriedades de amaciamento. Como exemplo, pode-se mencionar o seu uso em indústrias de carnes, pois possuem uma melhor especificidade para o substrato (Rao et al., 1998; Ryder et al., 2015).

As proteases microbianas podem ser produzidas tanto por fermentação submersa (FSm) como em estado sólido (FES). A FSm é definida como um processo fermentativo com excesso de água, sendo normalmente utilizada em processos industriais pela facilidade de manuseio, de escalonamento e de controle de parâmetros, porém apresenta dificuldades em sua aplicação em escala industrial devido à restrição no controle e monitoramento das variáveis durante o processo (Gibbs et al., 2000).

A FES é definida como qualquer processo de fermentação realizado sobre um material não-solúvel, o qual atua tanto como o suporte físico como fonte de nutrientes e ocorre na ausência de água livre, necessitando que o substrato esteja umedecido o suficiente para suportar o crescimento e metabolismo microbiano (Pandey, 2003). Economicamente, oferece muitas vantagens, incluindo uma produtividade volumétrica, uso de equipamentos mais simples, utilização de substratos de baixo custo, processamento simples e requisitos de energia mais baixos, quando comparados com a fermentação submersa (Paranthaman et al., 2009). Entretanto, a falta de controle de alguns parâmetros como umidade, oxigenação, pH e temperatura é a maior desvantagem, além de ser um bioprocesso limitado àqueles que crescem somente em ambientes com reduzida umidade (Mahadik et al., 2002). Ademais, quanto à purificação, é vantajosa porque o produto formado fica concentrado, o que facilita o processo. Porém, para eliminação dos resíduos, são necessárias etapas adicionais de purificação, as quais encarecem os custos de produção, pois os processos de purificação, especialmente as cromatografias, correspondem a mais de 70% do custo para obtenção de biomoléculas (Przybycien et al., 2004; Thömmes e Etzel, 2007).

Proteases com novas especificidades e estabilidade sob condições extremas são necessárias para várias aplicações. Por isso, o uso da engenharia genética de enzimas clonadas e a exploração de novos nichos para a obtenção de novas proteases é de grande importância. Ensaio rápidos, fáceis, convenientes e sensíveis são necessários para detectar proteases. A detecção da protease pode ser feita por meio de diferentes substratos proteicos e acompanhada pelo desaparecimento do substrato ou pelo surgimento do produto (Kasana et al., 2011).

Tendo em vista que o conhecimento e a utilização de enzimas proteolíticas no ramo biotecnológico têm aumentado globalmente, especialmente aquelas obtidas a partir de microrganismos, este trabalho tem como objetivo reunir informações sobre a produção de proteases a partir de cultivos microbianos, além de abordar as características gerais dos cultivos e das enzimas obtidas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Realizou-se uma revisão sistematizada da produção de proteases por microrganismos de aplicações biotecnológicas. Para esta pesquisa, foram utilizados três descritores em língua inglesa: “Proteases”, “Microorganisms” e “Biotechnology”. O operador booleano utilizado foi o “AND”. A partir desses descritores, realizou-se a busca na base de dados eletrônicos Pubmed.

Os limites de busca adotados pautaram-se em publicações disponíveis em texto completo, com livre acesso ou restrito, escritos em língua inglesa. Foram considerados como critérios de inclusão: aplicação biotecnológica das proteases e dos microrganismos; produção de proteases por microrganismos; uso de processos biotecnológicos para obtenção de proteases. Já os critérios de exclusão foram: artigos indisponíveis para *download*; artigos que não tratam da produção biotecnológica de proteases; estudos clínicos; artigos que não descrevem o processo de obtenção das proteases; artigos que tratam de proteases que não são produzidas por microrganismos. As revisões de literatura foram utilizadas apenas para análise e contextualização do assunto.

Os trabalhos foram classificados segundo o nome do autor, o ano de publicação, o microrganismo utilizado, as condições de fermentação (envolvendo o tipo, o meio de cultivo e os parâmetros) e os dados relativos à enzima obtida (tipo, método de determinação da atividade proteolítica e condições de estabilidade).

Todos os resumos foram lidos e analisados por um único pesquisador. A pesquisa foi realizada entre os dias 16 e 22 de outubro de 2014. O ano de publicação dos artigos não foi considerado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta busca, foram encontrados 95 artigos científicos. Os mesmos foram publicados a partir de setembro de 1986 até junho de 2014, sendo todos os artigos analisados conforme descrito na Figura 2.

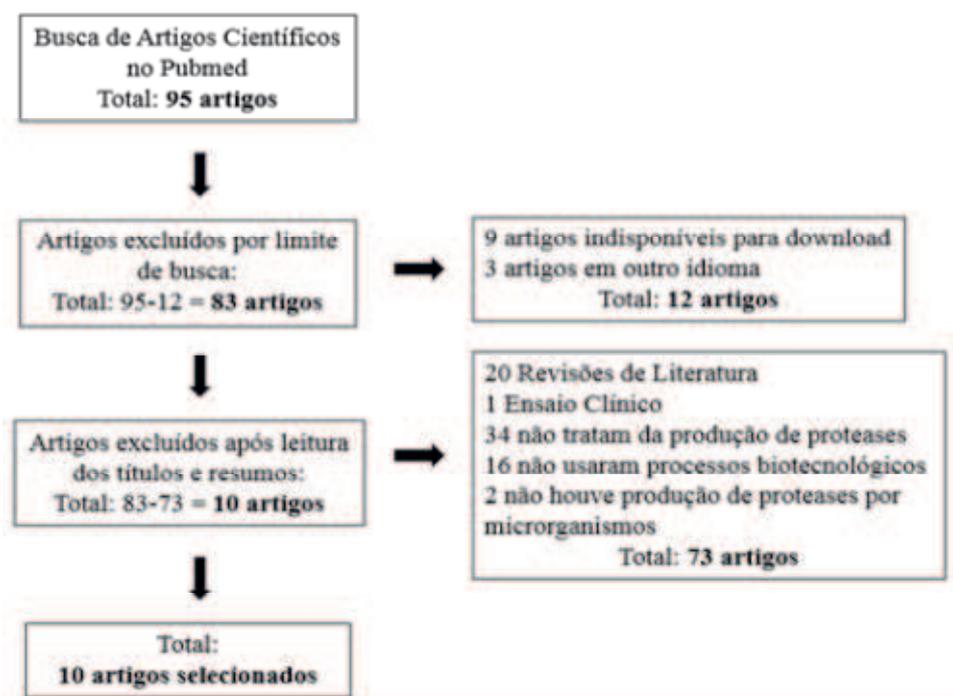


Figura 2. Etapas da busca sistemática e seleção dos artigos

Os Quadros 1 e 2 apresentam os 10 artigos que se encaixaram nos critérios de inclusão e informações gerais como os nomes dos autores e o ano de publicação. O Quadro 1 apresenta os dados referentes ao cultivo, como: microrganismo utilizado, tipo de fermentação utilizado, condições e meios de cultivo. Já o Quadro 2 apresenta informações pertinentes às enzimas, como: tipo de protease obtida, método de determinação da atividade proteolítica e parâmetros relativos à atividade ótima da enzima.

Quadro 1. Dados relativos aos cultivos para obtenção das enzimas

Nº	Autores/Ano	Microrganismo utilizado	Tipo de fermentação	Condições de fermentação	Meio de cultivo
1	Habbeche et al., 2014	<i>Actinomadura keratinilytica</i> (Cpt29)	Submersa em agitador rotatório	168 h; 45 °C; 200 rpm; pH 8,5	Elementos traço (g.L ⁻¹): 1,5 NaCl; 1 H ₂ PO ₄ ; 1 K ₂ HPO ₄ ; 0,5 KCl; 1,5 MgSO ₄ .7H ₂ O. 15 farinha de penas de galinha (única fonte de carbono e nitrogênio).
2	Jaouadi et al., 2013(a)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CTM50182)	Submersa em agitador rotatório	48 h; 37 °C; 250 rpm;	(Em g.L ⁻¹) 15 caseína; 5 peptona de soja; (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1

		clonada em <i>Escherichia coli</i>		pH 9,0	MgSO ₄ ·7H ₂ O; 1 CaCl ₂ ; 0,5 K ₂ HPO ₄ ; 0,5 KH ₂ PO ₄ ; 1 NaCl. Elementos traço: 2% (V/V; g.L ⁻¹): 0,4 ZnCl ₂ ; 2 FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0,065 H ₃ BO ₃ e 0,135 MoNa ₂ O ₄ ·2H ₂ O.
3	Ball et al., 2013	Triagem de 45 microrganismos	Submersa sem agitação	4 °C até o meio de cultivo ficar turvo; demais parâmetros não informados	Reasoner's 2A (R2A) ou Caldo Luria-Bertani (LB); dependeu do microrganismo.
4	Darah et al., 2013	<i>Microsporium fulvum</i> (IBRL SD3)	Sólida	240 h (mistura: uma vez a cada 48 h); Temperatura ambiente (30 ± 2 °C)	16 g de farinha de penas de galinha; 0,7% (p/v) de extrato de levedura. Teor de umidade: 100%.
5	Jaouadi et al., 2013(b)	<i>Brevibacillus brevis</i> (US575) clonada em <i>E. coli</i>	Submersa em agitador rotatório	72 h; 37 °C; 250 rpm; pH 7,4	Proporção (g.L ⁻¹): 10 farinha de penas de galinha; 5 peptona de soja; 2 (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 1 MgSO ₄ ·7H ₂ O; 5 CaCl ₂ ; 1 K ₂ HPO ₄ ; 1 KH ₂ PO ₄ ; 5 NaCl e elementos traço 2% (V/V): 0,4% ZnCl ₂ ; 2% FeSO ₄ ·7H ₂ O; 0,065% H ₃ BO ₃ e 0,135% MoNa ₂ O ₄ ·2H ₂ O.
6	Sales et al., 2013	<i>Bacillus</i> sp. (UFPEDA 485)	Submersa; equipamento não informado	84 h; 37 °C; 150 rpm; pH não informado	Soja (2% m/v); K ₂ HPO ₄ (0,435% m/v); 1 mL de solução mineral composta por FeSO ₄ ·7H ₂ O (100 mg), MnCl ₂ ·4H ₂ O (100 mg), e ZnSO ₄ ·H ₂ O (100 mg) e água destilada q.s.p. 100 mL, NH ₄ Cl (0,1 % m/v), MgSO ₄ ·7H ₂ O (0,06 % m/v) e glicose (1 % m/v).
7	Kang et al., 2013	<i>Aspergillus niger</i> (2.169): clonada em <i>E. coli</i> e expressão	Submersa; equipamento não informado	48 h; 30 °C; Agitação e pH não informados	1,0 g de K ₂ HPO ₄ ; 0,4 g de KH ₂ PO ₄ ; 0,5 g de KCl; 0,5 g de MgSO ₄ ·7H ₂ O; 0,01 g de FeSO ₄ ·7H ₂ O; 5,0 g

		em <i>Pichia pastoris</i>			de glicose e 15,0 g de colágeno.
8	Jaouadi et al., 2012	<i>Bacillus subtilis</i> strain DB430 (trpC npr apr epr bpf ispl): clonagem em <i>E. coli</i> strain (DH5a). <i>B. pumilus</i> (BS): doador do gene produtor de proteases	Submersa; equipamento não informado	Duração: não informada; 37 °C; 250 rpm; pH 7,4	Caldo LB: (g.L ⁻¹): 10 peptona; 5 extrato de levedura; 5 NaCl.
9	Moshumi e Jayachandra, 2012	<i>Bacillus pumilus</i> (MB 40)	Submersa em agitador rotatório	120 h; 25 °C; 150 rpm; pH não informado	Caldo Zobell Marine (ZMB).
10	Fuzele et al., 2011	Triagem de 9 microrganismos	Submersa; equipamento não informado	48 h; 30 °C; 120 rpm; pH 7.0 + 0.2	Meio de sal marinho (Marine salt medium: MSM): (Composição por litro: 81,0 g NaCl; 10,0 g extrato de levedura; 9,6 g MgSO ₄ ; 7,0 g MgCl ₂ ; 5,0 g peptona para protease n° 3; 2,0 g KCl; 1,0 g glicose; 0,36 g CaCl ₂ ; 0,06 g NaHCO ₃ e 0,026 g NaBr).

Quadro 2. Dados relacionados às proteases obtidas após o cultivo dos microrganismos

Nº	Autores/Ano	Tipo de Protease obtida	Método de determinação da atividade proteolítica	Atividade ótima da enzima
1	Habbeche et al., 2014	Queratinase	Quantitativo: Queratina Azure, com modificações	pH 10,0; Temperatura: 70 °C
2	Jaouadi et al., 2013	Elastase; Queratinase	Quantitativo: método de Riffel e Brandelli e Queratina Azure, respectivamente	pH 12,0; Temperatura: 80 °C
3	Ball et al., 2013	Não especificado	Qualitativo: meio R2A suplementado com 10 g.L ⁻¹ de <i>skim milk</i>	Testes não realizados

4	Darah et al., 2013	Queratinase	Quantitativo: Friedrich et al., (1999) com modificações	Testes não realizados
5	Jaouadi et al., 2013	Queratinase	Quantitativo: Queratina Azure ou azocaseína como substrato	pH 8,0; Temperatura: 30 °C
6	Sales et al., 2013	Metaloprotease	Quantitativo: Ensaio de degradação de fibrina	pH 7,0; Temperatura: 37 °C
7	Kang et al., 2013	Prolyl endopeptidases	Quantitativo: Edens et al.	pH 4,0; Temperatura: 37 °C
8	Jaouadi et al., 2012	Queratinase	Quantitativo: Queratina Azure	pH 12,0; Temperatura: 65 °C
9	Moshumi e Jayachandran, 2012	Caspases	Quantitativo: Kit comercial de ensaio fluorométrico (Calbiochem)	Testes não realizados
10	Fuzele et al., 2011	Não especificado	Qualitativo: triagem em placas de ágar <i>skim milk</i> Quantitativo: ensaio caseinolítico	pH 7,0; Temperatura: 40 °C

As enzimas proteolíticas são de grande importância biológica, possuindo também diversas aplicações nas indústrias de alimentos, bebidas, couro, detergentes, produtos farmacêuticos e médicos (Grupta et al., 2002; Sumantha et al., 2006; Theron e Divol, 2014).

Como observado no Quadro 1, a grande maioria dos trabalhos utilizou a fermentação submersa como método de obtenção das enzimas. Apenas um utilizou a fermentação sólida. Apesar da grande vantagem do ponto de vista econômico, a fermentação sólida se restringe a microrganismos que crescem em baixos níveis de umidade; ademais, outras desvantagens deste método se relacionam às dificuldades para a remoção do calor gerado pelo processo de respiração do microrganismo, além do controle de parâmetros como umidade, pH, oxigênio, gás carbônico e produtos formados (Roussos et al., 1991; Mahadik et al., 2002; Orlandelli et al., 2012). Em contrapartida, a fermentação submersa apresenta as seguintes vantagens frente à fermentação no estado sólido: facilidade de controle dos parâmetros físico-químicos (como controle de temperatura devido ao alto teor de água), melhor absorção de nutrientes e recuperação de metabólitos e redução da possibilidade de degradação do produto, principalmente enzimas com baixa termoestabilidade (Castro e Pereira Jr., 2010).

Pesquisadores têm dado ênfase à investigação de fontes ainda pouco exploradas, pois organismos obtidos nestes ecossistemas estão frequentemente associados à nova diversidade química. Por exemplo, dos 10 artigos avaliados, 5 tratam da identificação de microrganismos coletados nos mais diversos ambientes, além da investigação a respeito da produção de proteases. No trabalho realizado por Jaouadi et al. (2013a), as amostras foram coletadas no solo de diferentes locais da Tunísia; Habbeche et al. (2014) coletaram actinomicetos em compostagem de aves advindas de uma fazenda na Argélia; Ball et al. (2013) investigaram microrganismos colhidos em amostras de gelo da Venezuela; Jaouadi et al. (2013b) coletaram amostras de solo contaminado de um curtume da Tunísia; por fim, Fuzele et al. (2011) isolaram microrganismos a partir de amostras colhidas no Oceano Índico, de diferentes locais.

Como se sabe, a biodiversidade de microrganismos existente em todo o mundo é infinitamente grande. Estudos de bioprospecção são ótimas alternativas para se obter diferentes produtos, além do possível isolamento de um grande número de espécies. É comum encontrar estudos nos quais faz-se triagens da microbiota de determinado ambiente, em busca de produtos específicos ou não. Neste trabalho, observa-se que Ball et al. (2013) e Fuzele et al. (2011) usaram desta prática, na tentativa de encontrar microrganismos produtores de proteases sem, contudo, identificar o subtipo das mesmas.

O conceito de diversidade biológica está diretamente atrelado à diversidade química, pois as condições ambientais podem influenciar na quantidade e no tipo de metabólitos produzidos por microrganismos. As condições de cultivo, como a composição, o tipo e a concentração dos constituintes que compõem o meio de cultura, além do período de incubação, pH e temperatura de cultivo são fatores determinantes na produção dos metabólitos microbianos. Assim, as condições de cultivo citadas no Quadro 1 são distintas e a composição dos meios de cultivo são, por vezes, complexas, pois devem resultar da otimização dos parâmetros necessários para obtenção das enzimas.

Dos 10 trabalhos avaliados, 5 tratam da obtenção de queratinases, as quais constituem um grupo de metalo ou serino proteases que podem degradar estruturas insolúveis, formando substratos de queratina. Alguns dos grupos botânicos das plantas produzem queratinases, as quais degradam a queratina do cabelo e da lã. Este processo é importante para a produção de aminoácidos

essenciais, tais como a lisina, bem como para a prevenção do entupimento de sistemas de esgoto (Rao et al., 1998; Jaouadi et al., 2013b).

De acordo com Kasana et al. (2011), vários métodos qualitativos e quantitativos são utilizados na medição da atividade proteolítica em extratos brutos, parcialmente ou totalmente purificados. A quantidade de proteases produzida pode ser medida através da determinação da taxa de consumo do substrato ou a taxa de produção do produto. No Quadro 2, observa-se que as metodologias de quantificação das proteases diferem, até entre proteases do mesmo grupo. Para quantificação de queratinases, observa-se que os seguintes métodos são utilizados na quantificação: Queratina Azure (com e sem modificações); uma metodologia proposta por Friedrich et al. (1999) com modificações e um método que utiliza azocaseína como substrato. Essas diferentes metodologias podem influenciar numa diferença entre os resultados obtidos, ou seja, nas quantidades de proteases obtidas nos estudos, o que torna os valores obtidos incomparáveis, havendo necessidade de converter as unidades de medida. Assim, é interessante que se busque uma padronização de metodologias para que os resultados obtidos em diferentes estudos sejam comparáveis.

Os estudos de estabilidade e de atividade ótima das enzimas são importantes para definir suas aplicabilidades e viabilidades, além de ditarem as condições de armazenamento das mesmas. Por exemplo, a utilização de proteases em formulações de detergentes requer que estas enzimas possuam elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura (Kumar e Takagib, 1999; Nascimento e Martins, 2006). Além disso, a atividade enzimática em temperaturas elevadas favorece a utilização das enzimas em soluções detergentes, devido à utilização de temperaturas elevadas nos processos de limpeza (Gessesse et al., 2003; Nascimento e Martins, 2006).

4. CONCLUSÃO

As proteases são um grupo de enzimas com reconhecida importância biológica e que se destacam pelas suas diversas aplicações industriais e biotecnológicas. Apesar de serem produzidas por todos os organismos vivos, os

microrganismos vêm se destacando como ótimos produtores de tais enzimas, visto que são facilmente manipuláveis geneticamente e, no geral, são pouco exigentes quanto às condições de cultivo. Assim, diante da necessidade de se obter mais fontes de metabólitos, incentiva-se a investigação da produção de enzimas proteolíticas por diferentes microrganismos. Ademais, observa-se uma necessidade de padronização das metodologias de quantificação das proteases, visto que só assim será possível comparar os resultados de diferentes estudos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ball, MM, Gómez, W, Magallanes, X, Rosales, R, Melfo, A, Yarzabal, LA (2013) Bacteria recovered from a high-altitude, tropical glacier in Venezuelan Andes. *World J Microb Biot*30(3):931-941.

Castro, AM, Pereira Jr., N (2010) Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quim. Nova*33(1):181-188.

Darah, I, Nur-Diyana, A, Nurul-Husna, S, Jain, K, Lim, SH (2013) *Microsporium fulvum* IBRL SD3: As Novel Isolate for Chicken Feathers Degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*171:1900–1910.

Friedrich, J, Gradisar, H, Mandin, D, Chaumont, JP (1999) *Lett Appl Microbiol*28:127-130.

Fox, JW, Shannon, JD, Bjarnason JB (1991) Proteinases and their inhibitors in biotechnology, enzymes in biomass conversion. *ACS Symp Ser*460:62–79.

Fulzele, R, DeSa, E, Yadav, A, Shouche, Y, Bhadekar, R (2011) Characterization of novel extracellular protease produced by marine bacterial isolate from the indian ocean. *Braz J Microbiol*42:1364-1373.

Gessesse, A, Hatti-Kaul, R, Gashe, BA, Mattiasson, B (2003) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb Tech*32:519-524.

Gibbs, PA, Seviour, RJ, Schmid F (2000) Growth of Filamentous Fungi in Submerged Culture: Problems and Possible Solutions. *Crit Rev Biotech*20(1):17-48.

Gupta, R, Beg, QK, Lorenz, P (2002) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol*59:15-32.

Habbeche, A, Saoudi, B, Jaouadi, B, Haberra, S, Kerouaz, B, Boudelaa, M, Badis, A, Ladjama, A (2014) Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete

Actinomadura keratinolytica strain Cpt29 isolated from poultry compost. J Biosci Bioeng117(4):413-421.

Jaouadi, B, Jaouadi, NZ, Rekika, H, Naili, B, Beji, A, Dhoubc, A, Bejar, S (2013a) Biochemical and molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* CTM50182 organic solvent-stable elastase. Int J Biol Macromol60:165–177.

Jaouadi, NZ, Jaouadi, B, Aghajari, N, Bejar, S (2012) The overexpression of the SAPB of *Bacillus pumilus* CBS and mutated *sapB*-L311/T33S/N99Y alkaline proteases in *Bacillus subtilis* DB430: New attractive properties for the mutant enzyme. Bioresour Technol105:142–151.

Jaouadi, NZ, Rekik, H, Badis, A, Trabelsi, S, Belhoul, M, Yahiaoui, AB, Aicha, HB, Toumi, A, Bejar, S, Jaouadi, B (2013b) Biochemical and Molecular Characterization of a Serine Keratinase from *Brevibacillus brevis* US575 with Promising Keratin-Biodegradation and Hide-Dehairing Activities. Plos One8(10):1-17.

Joo, HS, Kumar, CG, Park, GC, Paik, SR, Chang, CS (2003) Oxidant and SDS-stable alkaline protease from *Bacillus clausii* I-52: production and some properties. J App Microbiol95:267–272.

Kang, C, Yu, XW, Xu, Y (2013) Gene cloning and enzymatic characterization of an endoprotease Endo-Pro-*Aspergillus niger*. J Ind Microbiol Biotechnol40:855-864.

Kasana, RC, Salwan, R, Yadav, SK (2011) Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. Crit Rev Microbiol37(3):262–276.

Kuddus, M, Ramteke, PW (2012) Recent developments in production and biotechnological applications of cold-active microbial proteases. Crit Rev Microbiol 38(4):330–338.

Kumar, CG, Takagi, H (1999) Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotech Adv17:561–594.

Mahadik, ND, Puntambekar, US, Bastawde, KB, Khire, JM, Gokhale, DV (2002) Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. Proc Biochem38:715-721.

Mokashe, N, Chaudhari, A, Patil, U (2015) Optimal production and characterization of alkaline protease from newly isolated halotolerant *Jeotgalicoccus* sp. Biocatal Agricult Biotech(2):235–243.

Moushumi-Priya, A, Jayachandran, S (2012) Induction of apoptosis and cell cycle arrest by Bis (2-ethylhexyl) phthalate produced by marine *Bacillus pumilus* MB 40. Chem Biol Interact195:133–143.

Mukhtar, H, Haq, IU (2012) Concomitant production of two proteases and alpha-amylase by a novel strain of *Bacillus subtilis* in a microprocessor controlled bioreactor. *Braz J Microbiol*43(3):1072-1079.

Muri, EMF (2014) Proteases virais: importantes alvos terapêuticos de compostos peptidomiméticos. *Quim. Nova*37(2): 308-316.

Nascimento, WCA, Martins, MLL (2006) Produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciênc Tecnol Aliment*26(3): 582-588.

Orlandelli, RC, Specian, V, Felber, AC, Pamphile, JÁ (2012) Enzimas de interesse industrial: produção por fungos e aplicações. *SaBios: Rev. Saúde e Biol*7(3):97-109.

Pandey, A (2003) Solid-state fermentation. *Biochem Eng J*13:81–84.

Paranthaman, R, Alagusundaram, K, Indhumathi, J (2009) Production of Protease from Rice Mill Wastes by *Aspergillus niger* in Solid State Fermentation. *World J Agr Sci*5(3):308-312.

Przybycien, TM, Pujar, NS, Steele, LM (2004) Alternative bioseparation operations: life beyond packed-bed chromatography. *Curr Opin Biotechnol*15(5): 469-78.

Rao, MB, Tanksale, AM, Ghatge, MS, Deshpande, VV (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiol Mol Biol Rev*62(3):597–635.

Roussos, S, Olmos, A, Raimbault, M, Saucedo-Castañeda, G, Lonsane, BK (1991) Strategies for large scale inoculum development for solid state fermentation system: conidiospores of *Trichoderma harzianum*. *Biotechnol Tech*5(6): 415-420.

Ryder, K, Há, M, Bekhit, AE, Carne, A (2015) Characterisation of novel fungal and bacterial protease preparations and evaluation of their ability to hydrolyse meat myofibrillar and connective tissue proteins. *Food Chem*172:197-206.

Sales, AE, Souza, FASD, Teixeira, JA, Porto, TS, Porto, ALF (2013) Integrated Process Production and Extraction of the Fibrinolytic Protease from *Bacillus* sp. UFPEDA 485. *Appl Biochem Biotechnol*170:1676–1688.

Silva, MA (2011) Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis*. Recife, Brasil, 73p. (Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Pernambuco).

Sumantha A, Larroche C, Pandey, A (2006) Microbiology and Industrial Biotechnology of Food-Grade Proteases: A Perspective. *Food Technol. Biotechnol*44(2): 211–220.

Theron, LW, Divol, B (2014) Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. *Appl Microbiol Biotechnol*98:8853–8868.

Thömmes, J, Etzel, M (2007) Alternatives to chromatographic separations. *Biotechnol Prog*23(1):42-5.

Capítulo 2:
Fungos filamentosos do
Semiárido paraibano

Artigo a ser submetido ao *Applied Microbiology and Biotechnology*, formatado segundo as normas do periódico.
(ISSN: 0175-7598 / Qualis para Farmácia: A2 / Fator de Impacto (2013): 3.811)

PRODUÇÃO DE PROTEASES POR DIFERENTES FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS EM UM COQUEIRAL DO SEMIÁRIDO PARAIBANO

Suellen Emilliany Feitosa Machado¹; Valker Araújo Feitosa²; Alysson Wagner Fernandes Duarte³; Lara Durões Sette³; José Alexsandro da Silva¹; Edeltrudes de Oliveira Lima⁵; Angela Faustino Jozala⁴; Harley da Silva Alves¹; Adalberto Pessoa Júnior²

¹ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – Brasil.

² Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – Brasil.

³ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Rio Claro - Brasil.

⁴ Universidade de Sorocaba, Sorocaba – Brasil.

⁵ Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa – Brasil.

Resumo:

Os fungos filamentosos são utilizados industrialmente na obtenção de pigmentos, enzimas, antibióticos e outros metabólitos. Dentre as enzimas, destacam-se as proteases, que possuem aplicações em produtos farmacêuticos, alimentícios, detergentes etc. Este trabalho teve como objetivos isolar fungos filamentosos coletados de amostras de coqueiros e solo de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil, fazer um *screening* quanto à produção de proteases, identificar a espécie melhor produtora, traçar seu perfil de produção destas enzimas e investigar o mesmo é produtor de micotoxinas. Coletou-se amostras de diferentes partes dos coqueiros e solo. Os 32 fungos isolados foram cultivados em agitador rotatório utilizando caldo Sabouraud, a 30 °C, 200 rpm por 72 horas e encaminhados à análise qualitativa da atividade proteolítica em ágar *skim Milk* a 10%. Halos transparentes indicavam resultados

positivos. Os gêneros dos fungos foram identificados por microcultivo em lâmina. A espécie inicialmente denominada Fung1, que apresentou melhor resultado na etapa qualitativa, foi encaminhada à identificação molecular e selecionada para a produção em agitador rotatório (30 °C/ 200 rpm/ 240 horas). A cada 24 horas, um frasco foi retirado do agitador, totalizando 10 amostras. Foram medidos pH, biomassa (determinada por peso seco) e produção de proteases (analisada quantitativamente utilizando azocaseína). A atividade enzimática máxima do Fung1, identificado como *Aspergillus tubingensis*, foi 29 U.mL⁻¹, após 144 horas de cultivo. A maior biomassa foi 11,62 g.L⁻¹ após 240 horas. Os resultados indicaram que *A. tubingensis* produz proteases, porém necessita-se de outros estudos para otimizar a produção e classificar as proteases.

Palavras-chave: enzimas proteolíticas; fungos filamentosos; fungos do solo; enzimas fúngicas; *Aspergillus tubingensis*.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas proteolíticas pertencem ao grupo das hidrolases, as quais catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas - sua principal função biológica - e podem apresentar atividade sobre ligações éster e amida. Ademais, executam diversas funções fisiológicas complexas e estão envolvidas nos processos de digestão, ativação de enzimas, coagulação do sangue e no transporte de proteínas através da membrana (Rao et al. 1998; Koblitz 2010).

Proteases são utilizadas na fabricação de detergentes, bebidas, alimentos, em indústrias de produtos farmacêuticos, têxteis, papel, celulose e couro (Bennett 1998; Dekker 2003). Assim, tais enzimas possuem um valor econômico representativo; segundo Haddar et al. (2010), são responsáveis por aproximadamente 60% de todas as vendas de enzimas.

As proteases são amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em plantas, animais e microrganismos. Estes últimos são muito atrativos como fontes de enzimas em virtude das suas propriedades desejáveis sob o ponto de vista industrial: possuem rápido crescimento, exigem pouco

espaço para cultivo e podem ser facilmente manipulados geneticamente para produzir novas enzimas, sendo a concentração celular destas potencialmente induzida ou incrementada por meio de manipulações genéticas ou de modificações das condições de cultivo (Busto et al. 1995; Alnahdi 2012). Cerca de dois terços das proteases produzidas comercialmente são de origem microbiana (Balachandran et al. 2012).

Dentre os microrganismos que sintetizam enzimas proteolíticas, destacam-se os fungos filamentosos. Apesar de muitas espécies serem infecciosas e causarem doenças em seres humanos, outros animais e plantas, outras produzem metabólitos úteis, como enzimas, pigmentos, vitaminas e antibióticos. Sendo assim, investigadores têm estudado espécies de fungos não apenas para compreender as doenças causadas por eles, mas também para identificar metabólitos, pois sabe-se que uma característica importante dos fungos filamentosos é a sua utilização industrial através de enzimas e ácidos orgânicos por eles produzidos (Iwashita 2002; Schoberle et al. 2013). Ademais, o rápido crescimento, além da facilidade de cultivo e da purificação do produto, são características essenciais da utilização industrial de fungos, o que lhes confere um estimado interesse comercial (Archer 2000).

Os fungos possuem rápido crescimento e baixo custo de cultivo, o que possibilita uma análise do seu potencial biotecnológico de forma mais rápida, sob condições controladas em laboratório (Simões e Tauk-Tornisielo 2005; Santos et al. 2013).

Por produzirem diversos metabólitos de interesse comercial, investigadores têm estudado espécies de fungos não apenas para compreender as doenças causadas por eles, mas também para identificar metabólitos para fins industriais, pois sabe-se que uma característica importante dos fungos filamentosos é a sua utilização em várias indústrias devido à elevada eficiência na produção de diversos tipos de enzimas e até mesmo de novos antibióticos (Iwashita 2002; Schoberle et al. 2013). Além disso, a facilidade de cultivo em larga escala e a purificação do produto têm sido características essenciais da utilização comercial de fungos. O grande interesse em utilizar fungos como “fábricas celulares” pode ser vista a partir do grande número de grupos de pesquisa e empresas que têm participado de projetos catalogados no “Eurofung” (www.eurofung.net) e financiados pela União Europeia (Archer 2000).

O solo é o habitat microbiano terrestre mais diversificado e os fungos que o habitam desempenham funções importantes no ecossistema, como a decomposição de resíduos vegetais, liberando nutrientes que sustentam e estimulam as plantas no processo de crescimento (Hamayun et al. 2010). Devido ao seu extenso território e à sua grande biodiversidade, o Brasil apresenta potencial considerável para a busca de novos extratos enzimáticos microbianos, uma vez que a quantidade e a variedade de produtos naturais que podem ser extraídos são inúmeras, incluindo a notável diversidade microbiana ainda inexplorada, para aplicação imediata ou após melhoramento genético, visando a produção de enzimas por processos fermentativos (Zimmer et al. 2009).

Pesquisas voltadas para a obtenção de enzimas de interesse industrial, especialmente a partir de fontes naturais, são de grande relevância, já que muitos microrganismos são ubíquos e têm sido amplamente empregados na produção de diferentes substâncias de interesse econômico, como as proteases, tornando-se interessante explorar suas potencialidades. Desta maneira, este trabalho teve como objetivos isolar fungos filamentosos a partir de amostras coletadas de diversas partes dos coqueiros e do solo de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil, fazer um *screening* da produção de proteases, identificar a espécie fúngica melhor produtora, traçar o seu perfil de produção destas enzimas e investigar se a mesma produz micotoxinas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e isolamento dos microrganismos

As amostras obtidas nesse estudo foram coletadas em um coqueiral localizado na região das Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil (Latitude: 6°45'17.57" S; Longitude: 38°7'23.31"), a partir de fragmentos retirados das superfícies de raízes, dos caules, das folhas e dos frutos dos coqueiros, bem como em regiões superficiais e mais profundas (10 cm) do solo, a fim de coletar espécies fúngicas e formar uma micoteca (Figura 1). Após a coleta, a assepsia das amostras foi realizada seguindo os protocolos propostos por Araújo et al. (2009) para as amostras do vegetal e Colla et al. (2008) para as amostras do solo.

Figura 1. Local da coleta das amostras superficiais das raízes, dos caules, das folhas e dos frutos de coqueiros e do solo do coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, PB, Brasil



(Fonte: Arquivo pessoal; Data: 19/04/2013)

Após a desinfestação, as amostras foram transferidas assepticamente para a superfície do meio BDA (Batata Dextrose-Ágar), em placas de Petri, suplementado com antibióticos (cloranfenicol $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ para os fragmentos do vegetal e estreptomicina $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ para amostras do solo), a fim de suprimir o crescimento bacteriano. As placas foram incubadas a temperatura de $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 25 dias, sendo verificadas diariamente. Ao longo deste período, as colônias de fungos que foram surgindo eram isoladas, até que em cada placa houvesse apenas colônia (s) de um mesmo fungo. Os fungos isolados foram mantidos em BDA para realização dos testes subsequentes e posterior identificação.

Atualmente, os microrganismos isolados encontram-se armazenados em água destilada estéril, segundo a metodologia proposta por Castellani (1939).

2.2 Cultivo em agitador rotatório

Para se obter os extratos enzimáticos das espécies fúngicas, seguiu-se o protocolo proposto com Porto et al. (1996), com algumas adaptações. Os fungos isolados foram previamente cultivados em placas de Petri contendo meio BDA e incubados a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, por 120 horas. Três discos de cultura de cada amostra, medindo 5 mm de diâmetro cada, foram recortados e inoculados, separadamente, em frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL , contendo

25 mL de meio líquido (caldo Sabouraud), caracterizando um cultivo submerso. Posteriormente, os frascos foram dispostos em agitador rotatório (Hipper Química) a 200 rpm, a 30 °C ± 0,5, durante 72 horas, como ilustra a Figura 2.

Figura 2. Cultivo dos fungos em agitador rotatório a 200 rpm, a 30 °C ± 0,5, durante 72 horas



(Fonte: Arquivo pessoal.)

Após as 72 horas de cultivo, os frascos Erlenmeyer foram retirados do agitador rotatório e seus conteúdos foram filtrados a vácuo, separadamente, usando filtros qualitativos Whatman malha 1 (Whatman®). O conteúdo retido no filtro foi desprezado. Os volumes filtrados foram armazenados em tubos estéreis.

2.3 Screening para atividade proteolítica (qualitativa)

Para selecionar de modo qualitativo os microrganismos produtores de proteases, seguiu-se o protocolo proposto por Pereira et al (2001), com algumas adaptações. Utilizou-se um meio formulado com *skim Milk* (Difco) a 10% e ágar-ágar (ágar bacteriológico; Difco) a 2%. Tal avaliação foi realizada em placas de Petri contendo 50 mL do meio já citado. Na superfície do meio, foram feitas cavidades (poços) medindo 5 mm de diâmetro nos quais foi depositado,

separadamente, 0,1 mL de cada extrato fúngico. As placas foram incubadas em estufa de aquecimento (Tecnal), a 30 °C, durante 24 horas.

Decorrido este tempo, as placas foram observadas quanto à formação de halos ao redor das cavidades, o que indica a produção de proteases. Os halos foram medidos com o auxílio de um paquímetro. O fungo que proporcionou a formação do maior halo foi escolhido e encaminhado para as etapas subsequentes.

2.4 Quantificação da atividade proteolítica

O fungo selecionado na etapa anterior foi cultivado em agitador rotatório, a 200 rpm e 30 °C \pm 0,5, durante 240 horas. Foram preparados 10 frascos Erlenmeyer, com capacidade para 125 mL, contendo 25 mL de caldo Sabouraud. Em cada frasco, foram colocados 3 discos de cultura do fungo. Os frascos foram dispostos em agitador rotatório e a cada 24 horas um frasco foi retirado. O conteúdo do Erlenmeyer foi filtrado a vácuo, usando filtros qualitativos Whatman malha 1 (Whatman), previamente pesados. O volume filtrado foi utilizado para quantificar a atividade proteolítica total, ao passo que o conteúdo retido no filtro foi utilizado para determinar a biomassa.

A atividade proteolítica foi quantificada com o substrato azocaseína, seguindo a metodologia adaptada de Charney e Tomarelli (1947). Os tubos testes foram preparados com a adição de 0,15 mL de extrato enzimático filtrado (extratos fúngicos), 0,15 mL de reagente azocaseína 0,5% p/V em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Estes tubos foram incubados a 37 °C, por 40 minutos, em banho termorregulado (Nova Ética).

A reação foi interrompida pela adição de 0,15 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e o excesso de proteína precipitou. Em seguida, os tubos-teste foram centrifugados a 17000 xg, por 10 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, 0,1 mL do sobrenadante da amostra foi transferido para uma microplaca e adicionado 0,1 mL de hidróxido de potássio (KOH) a 0,5 M. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida, posteriormente, em espectrofotômetro (Molecular Devices) UV-visível a 430 nm.

Os brancos das amostras foram preparados da mesma maneira, só que foram previamente aquecidos a 100 °C, durante 20 minutos, para inativar as proteases presentes nestas amostras.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir aumento na absorbância de 0,001 por minuto de reação a 430 nm, sendo expressa em U.mL⁻¹. O fator de diluição desta reação equivale a 30. O resultado da atividade (UI) é multiplicado por 750, que é o resultado do seguinte quociente: $30/(0,001*40)$, onde 30 é o fator de diluição, 0,001 refere-se à absorbância e 40 refere-se ao tempo em que os tubos permanecem no banho termorregulado.

2.5 Determinação da biomassa

Os papéis de filtro utilizados foram previamente pesados. Após as filtrações, os conteúdos retidos no papel de filtro foram secos e pesados em uma balança (Shimadzu) para determinação de umidade por radiação infravermelho, a 120 °C. Os dados foram anotados para posterior tabulação.

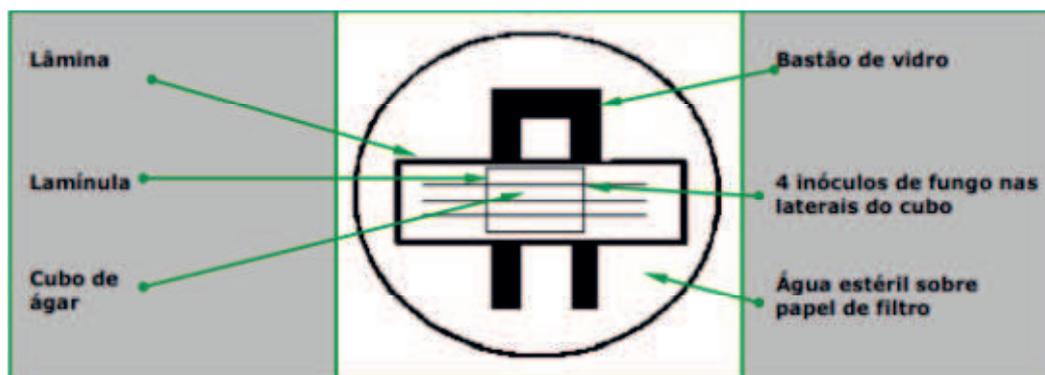
2.6 Identificação dos microrganismos

Todos os fungos foram classificados quanto ao gênero pela técnica de microcultivo em lâmina, proposta por Riddel (1950). O fungo que produziu o maior halo (etapa 2.3) foi identificado por técnicas moleculares.

2.6.1 Microcultivo em lâmina

Os gêneros dos fungos foram identificados pela técnica de microcultivo em lâmina, proposta por Riddel (1950). Para a realização da mesma, os fungos foram previamente cultivados em meio sólido. Em uma placa de Petri, colocou-se um bastão de vidro (em formato de U), o qual serviu de base para uma lâmina de vidro previamente esterilizada. Sobre a lâmina, colocou-se um fragmento retangular e fino de meio sólido ágar Sabouraud, medindo aproximadamente 1 cm². Este esquema é demonstrado na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da instrumentação necessária para realização da técnica de microcultivo em lâmina proposta por Riddel, 1950

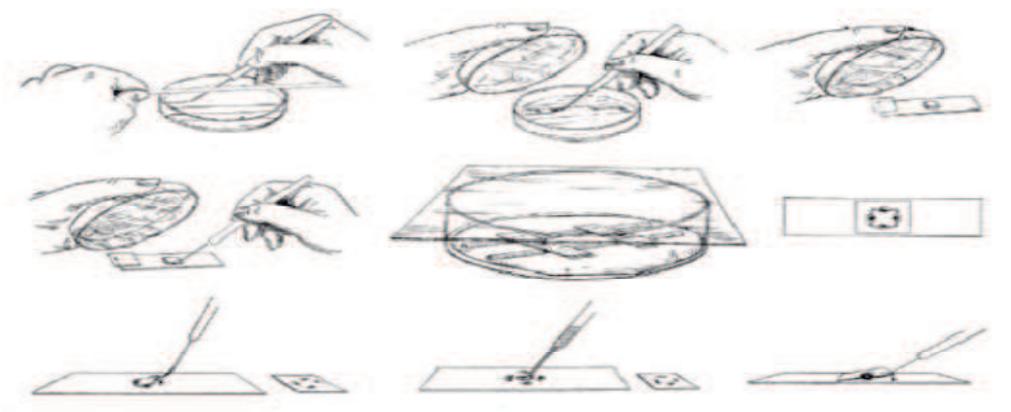


(Fonte: ANVISA, 2004)

Com uma alça de platina, retirou-se um fragmento da colônia do fungo e semeou-se em ambos os lados do meio de cultura. Colocou-se uma laminula limpa previamente flambada sobre o referido meio. O fundo da placa de Petri foi forrado com papel de filtro molhado com água destilada, para evitar ressecamento do meio.

O material foi incubado à temperatura ambiente. O crescimento foi observado diariamente. Após cinco dias, tempo necessário para que as colônias ficassem facilmente visíveis, retirou-se a laminula, que foi submetida à fixação com álcool a 70%, seguindo-se com a coloração com lactofenol azul de algodão. Ao microscópio (Nikon), examinou-se cuidadosamente os órgãos vegetativos e reprodutores dos fungos. As etapas desta técnica são ilustradas na Figura 4.

Figura 4. Etapas da técnica de microcultivo em lâmina



(Fonte: RIDDEL, 1950).

2.6.2 Identificação da espécie melhor produtora de proteases

O fungo escolhido foi identificado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, localizado na Universidade Estadual de Campinas (CPQBA/UNICAMP, Paulínia – SP).

A identificação molecular do fungo foi realizada por meio do sequenciamento e análise filogenética das regiões ITS1-5.8S-ITS2 do operon ribossomal e do gene da Calmodulina. Para tanto, o DNA genômico total da linhagem fúngica foi extraída de acordo com Da Silva et al. (2008), com modificações. Após a extração, as regiões ITS1-5.8S-ITS2 foram amplificadas com os primers ITS1F (5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') de acordo com Gardes e Bruns (1993) e o gene que codifica a Calmodulina foi amplificado com os primers Cf1 (5'-GCC GAC TCT TTG ACY GAR GAR -3') e Cf4 (5'- TTT YTG CAT CAT RAG YTG GAC -3'), de acordo com Peterson et al. (2005).

Os produtos de amplificação foram purificados antes de serem submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (Applied Biosystem). As sequências obtidas foram comparadas com sequências já existentes depositadas em bancos de dados, como o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas do GenBank para realização das análises filogenéticas. O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Clustal X (Thompson et al., 1994) do Bioedit e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 4.0 (Tamura et al. 2007). O modelo Kimura dois-parâmetros (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar as distâncias evolutivas e o algoritmo neighbor-joining (NJ) para a reconstrução filogenética, com valor de *bootstrap* calculado para 1000 réplicas.

2.6.3 Avaliação do potencial de produção de fumonisina B2 (FB2) pela espécie melhor produtora de proteases

A cepa Fung1 foi inoculada em meio ágar Czapek extrato de levedura 20% de sacarose (CY20S) e incubada a 25 °C por 168 horas, conforme a metodologia de Frisvad et al. (2007).

Após o crescimento, foram retirados 5 pequenos pedaços do micélio fúngico da parte central colônia e colocados em um tubo de ensaio, ao qual foi adicionado 1 mL de metanol e posteriormente agitado em um vórtex (Phoenix) durante 3 minutos. Em seguida, foram feitas 2 filtrações com membrana Millex (0,45 μm e 0,22 μm , respectivamente) acoplada a uma seringa de 5 mL, para limpar o extrato. Foram coletados 100 μL deste filtrado e transferidos para outro tubo de ensaio, acrescentando-se 100 μL de metanol. Em seguida, o frasco foi agitado em um vórtex e 55 μL do extrato foram transferidos para um vial para cromatografia líquida de alta eficiência com mais 55 μL do reagente *o-phthaldialdehydo* (OPA), a fim de derivatizar a fumonisina, conforme a metodologia proposta por Visconti et al. (2001).

2.6.3.1 Detecção de FB2 utilizando cromatografia líquida de alta eficiência

A detecção de FB2 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada segundo a metodologia de Visconti et al. (2001). Foi utilizado um cromatógrafo (Shimadzu LC-10VP, Shimadzu) com detector de fluorescência a 335 nm de excitação e 440 nm de emissão, equipado com coluna YMC – Pack ODS-A (YMC co., Ltd. Japan) (5 μm , 4,6 x 150 mm). Para a fase móvel, foi utilizado acetonitrila:água:ácido acético (51:47:2). A fase móvel foi filtrada em membrana de 0,45 μm . A vazão da fase móvel foi de 1 mL.min⁻¹. A temperatura do forno foi de 40 °C.

Foram colocados 55 μL do padrão FB2 e 55 μL do reagente OPA num vial para CLAE. Agitou-se o vial em vórtex por 30 segundos e, rapidamente, 20 μL desta mistura foram injetados no CLAE. O mesmo procedimento foi repetido para o extrato fúngico.

2.6.4 Avaliação do potencial de produção de de ocratoxina A (OTA) pela espécie melhor produtora de proteases

A mesma cepa testada na etapa anterior foi inoculada em meio ágar extrato de levedura sacarose (YESA) e incubada a 25 °C por 168 horas. Pequenos pedaços do micélio fúngico foram cortados da parte central, utilizando-se a técnica do ágar plug de Filtenborg et al. (1983). A eles, foram

adicionadas 3 gotas da solução clorofórmio:metanol (1:1) para a extração da toxina. Os pedaços de micélio foram aplicados em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) sílica gel-G 60 de 500 µm de espessura, juntamente com 5 µL do padrão de OTA. As placas foram colocadas em uma cuba com a fase móvel, constituída dos seguintes solventes: tolueno, acetato de etila, ácido fórmico a 90% e clorofórmio (na proporção 7:5:2:5). Após a confecção das placas e secagem dos solventes, as mesmas foram colocadas em câmara UV e observadas sob os comprimentos de onda de 356 e 254 nm. A fluorescência foi comparada qualitativamente com o padrão de OTA para avaliação da presença da toxina na amostra testada.

3. RESULTADOS

Um total de 32 fungos filamentosos, considerados morfologicamente diferentes após uma observação macroscópica, foi obtido a partir dos fragmentos das superfícies das raízes, dos caules e em regiões superficiais e mais profundas do solo. A maior quantidade de fungos foi coletada na superfície do solo (n=21; 65,63%), seguida pelas amostras coletadas em regiões mais profundas do mesmo (n=7; 21,88%), raízes (n=3; 9,38%) e caules (n=1; 3,11%). Não foi possível isolar nenhum fungo das folhas nem dos frutos dos coqueiros. Estes dados estão ilustrados na Figura 5.

3.1 *Screening* para atividade protease (qualitativa)

Dos 32 fungos obtidos, 23 (71,88%) formaram halos transparentes ao redor das cavidades feitas no ágar acrescido de *skim Milk*, os quais são indicativos de degradação de proteínas. Este resultado é apresentado na Tabela 1.

O fungo número 3, inicialmente nomeado Fung1 e que foi isolado da região mais superficial do solo do coqueiral, formou o maior halo indicador de atividade proteolítica, quando comparado aos demais fungos isolados. Portanto, considerou-se que o mesmo possui uma maior capacidade de quebrar as

proteínas do leite presentes no meio, nas condições testadas, dentre os fungos submetidos ao *screening* qualitativo. Na Figura 6 é possível visualizar a estrutura macroscópica do fungo Fung1, o qual foi encaminhado para as etapas subsequentes deste trabalho.

Figura 5. Distribuição dos fungos filamentosos obtidos através da coleta de amostras de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil

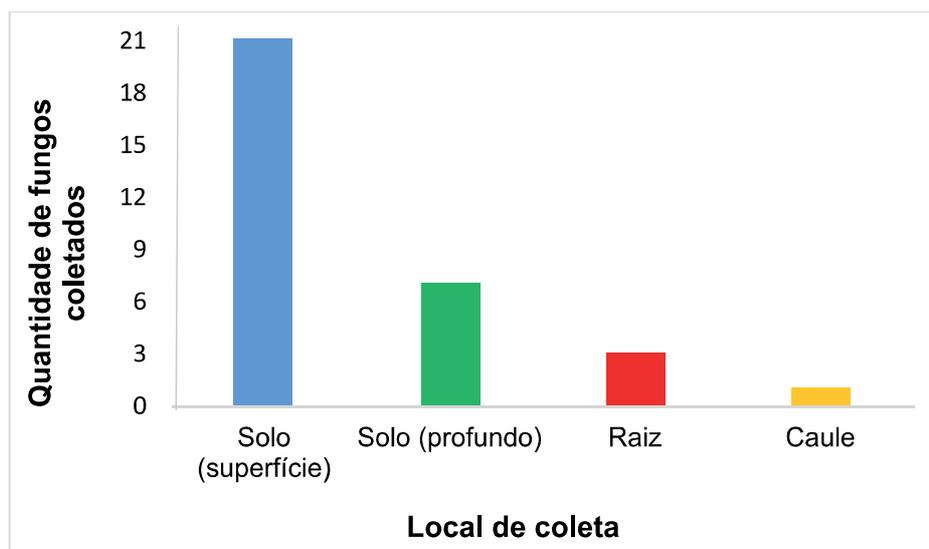


Tabela 1. Avaliação da formação de halos indicativos da produção de proteases em meio sólido contendo *skim Milk* a 10%, utilizando extratos fúngicos de 32 fungos isolados nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil

Nº do fungo	Formação de halo						
1	NF	9	++	17	NF	25	+
2	++	10	++	18	+	26	++
3	+++	11	+	19	NF	27	+
4	+	12	++	20	+	28	+
5	++	13	+	21	NF	29	+
6	+	14	+	22	NF	30	+
7	++	15	+	23	NF	31	NF
8	++	16	NF	24	NF	32	+

*NF: Não houve formação de halo; (+): 5< halos \geq 7 mm; (++) : 8-10 mm; (+++): halos \geq 11 mm.

Figura 6. Estruturas macroscópicas do fungo Fung1, isolado de um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil



(Fonte: Arquivo pessoal)

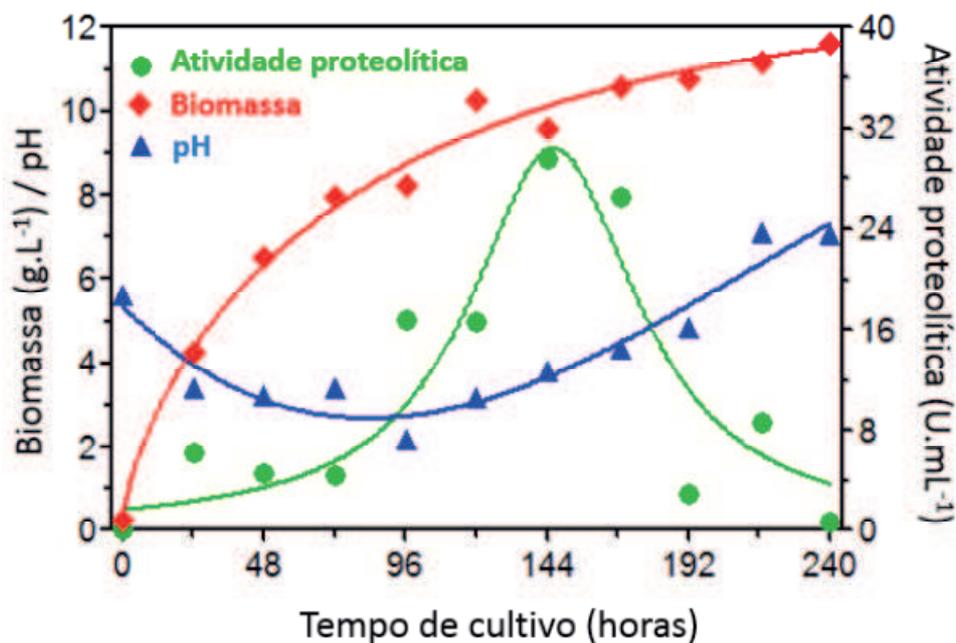
3.2 Quantificação da atividade proteolítica total e determinação da biomassa

Na Tabela 2 são apresentados os valores da atividade proteolítica, do pH e da biomassa dos extratos fúngicos do Fung1, após o cultivo de 240 horas realizado em agitador rotatório a $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ e 200 rpm, ao passo que a Figura 7 relaciona estes dados.

Tabela 2. Valores da atividade proteolítica, da biomassa e do pH dos extratos do Fung1, obtidos após o cultivo de 240 horas realizado em agitador rotatório a 200 rpm e $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$

Tempo (h)	Atividade proteolítica (U.mL ⁻¹)	pH	Biomassa (g.L ⁻¹)
0	0	5,60	0
24	6,30	3,40	4,26
48	4,65	3,21	6,54
72	4,50	3,42	7,94
96	16,73	2,21	10,58
120	16,60	3,20	10,26
144	29,48	3,80	9,58
168	26,55	4,36	8,22
192	2,93	4,84	10,74
216	8,63	7,10	11,18
240	0,68	7,08	11,62

Figura 7. Atividade proteolítica, biomassa e pH do Fung1, em cultivo realizado durante 240 h, a 200 rpm e 30 °C ± 0,5



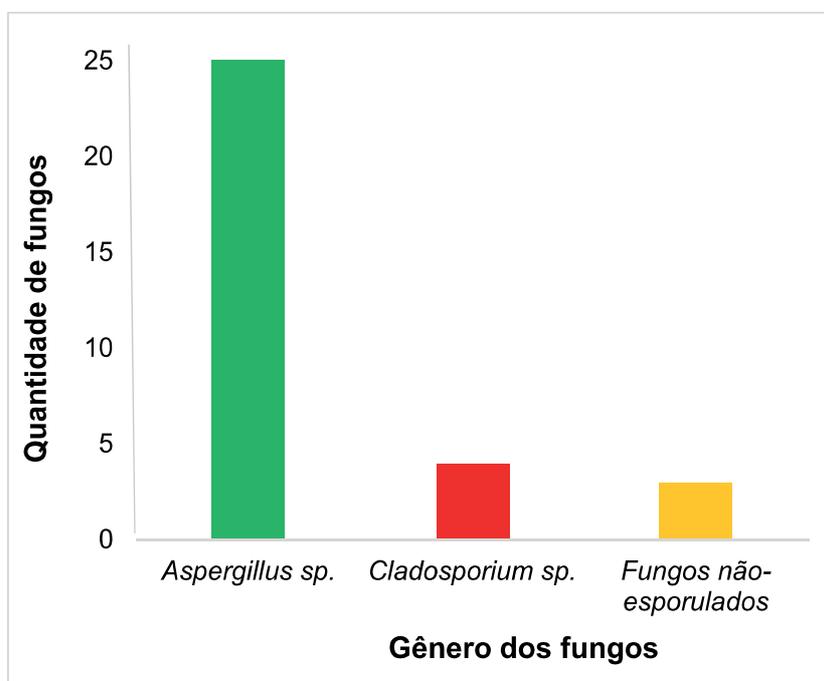
Observa-se, tanto na Tabela 2 como na Figura 7, que o Fung1 produz proteases de maneira crescente até as 144 horas de cultivo, momento em que atividade proteolítica máxima é alcançada (29,46 U.mL⁻¹). A partir deste período, houve um decréscimo de quase 44 vezes na atividade enzimática até o final do cultivo. Entretanto, podemos observar que o crescimento (biomassa) do fungo é crescente até o final do cultivo, isto é, 240 horas, no qual atinge seu valor máximo (11,62 g.L⁻¹). Este resultado sugere que o crescimento e a produção de proteases são inversamente proporcionais, supostamente porque o fungo consumiu a enzima e utilizou-a como substrato.

O pH inicial (equivalente a 5,61, valor do pH do caldo Sabouraud) cai para aproximadamente 3,40 nas primeiras 24 horas e se mantém ácido até as 192 horas; às 216 horas, torna-se neutro (7,10) e permanece nesta faixa até as 240 horas de cultivo.

3.3 Identificação dos microrganismos

Por meio da técnica de microcultivo em lâmina, foi possível observar os fungos macro e microscopicamente e, assim, identificar os gêneros dos fungos utilizados neste trabalho. Dos 32 fungos isolados, 25 (78,13%) pertencem ao gênero *Aspergillus sp.*, 4 (12,5%) ao gênero *Cladosporium sp.* e 3 não foram identificados por serem fungos não esporulados. Estes resultados encontram-se ilustrados na Figura 8.

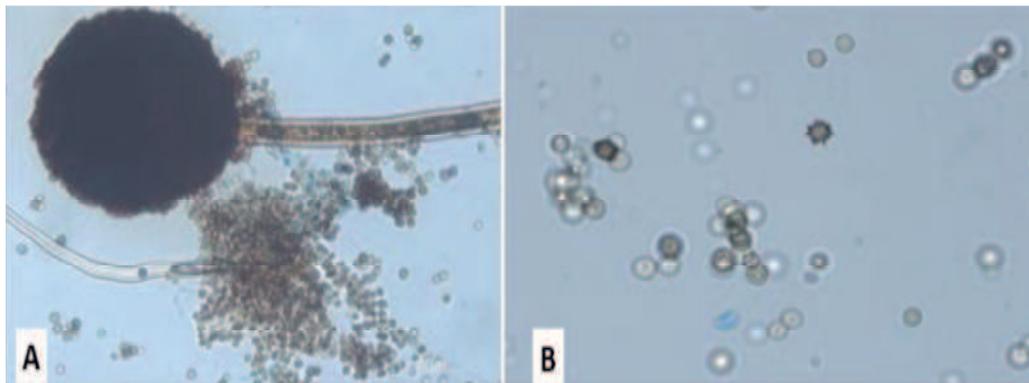
Figura 8. Fungos isolados em um coqueiral localizado nas Várzeas de Sousa, Paraíba, Brasil, agrupados de acordo com seus gêneros



3.3.1 Identificação da amostra Fung1

Análises preliminares de taxonomia convencional (macro e microscópicas) revelaram que Fung1 está relacionado ao gênero *Aspergillus* seção Nigri (Figura 9).

Figura 9. Aspecto microscópicos do isolado Fung1. A) Conidióforo característico do gênero *Aspergillus*; B) Conídios



Com base nestes resultados e considerando que espécies do gênero *Aspergillus* seção Nigri (*Black Aspergillus*) são fungos de ampla distribuição na natureza e de difícil identificação apenas por aspectos morfológicos, foram sequenciados e analisados dois diferentes marcadores taxonômicos (regiões ITS1-5.8S-ITS2 e o gene da Calmodulina).

Os dados derivados do sequenciamento das regiões do operon ribossomal ITS1-5.8S-ITS2 demonstraram 100% de similaridade de sequências com diferentes espécies de *Aspergillus* da seção Nigri. Esse resultado indica a alta conservação no marcador gênico utilizado, o que foi confirmado pelos resultados de filogenia. Na árvore filogenética gerada e apresentada na Figura 10, podemos verificar uma relação mais próxima da sequência ITS1-5.8S-ITS2 do isolado Fung1 com as sequências da mesma região das linhagens *Aspergillus tubingensis* CBS 116417 e *Aspergillus tubingensis* YMCA.

Visando confirmação da espécie, um segundo marcador taxonômico (gene que codifica para a Calmodulina) foi avaliado para o isolado Fung1. Os resultados do sequenciamento demonstraram alta similaridade (98%) do gene da Calmodulina do isolado Fung1 com sequências da mesma região gênica de diversas linhagens de *Aspergillus tubingensis* depositadas em reconhecidas coleções internacionais (NRRL e CBS).

Após avaliação dos resultados apresentados na árvore filogenética gerada (Figura 11), a identificação do Fung1 foi confirmada como *Aspergillus tubingensis*, visto que a sequência do gene da Calmodulina deste isolado formou um cluster intimamente relacionado com o cluster composto por 14

Atualmente, sabe-se que algumas espécies que pertencem à Seção Nigri ou dos “*Aspergillus negros*” são comprovadamente produtoras de toxinas, como a ocratoxina A e a fumonisina B2. Assim, para garantir a segurança da manipulação da cepa de *A. tubingensis* isolada neste estudo, realizaram-se testes para investigar se a mesma é produtora de ocratoxina A e fumonisina B2. Não foi detectada a produção de nenhuma das duas micotoxinas aqui citadas.

4. DISCUSSÃO

Microrganismos são utilizados na geração de diferentes produtos por processos fermentativos em função da facilidade de crescimento e adaptação em diferentes ambientes, diversidade bioquímica e manipulação genética (Kapoor e Mulimani 2010). Os fungos filamentosos são a fonte preferida de enzimas industriais devido à sua excelente capacidade de produzir proteínas extracelulares. Glucoamilase, celulase, lipase, glicose-oxidase, pectinase, lacase, catalase, fitase e proteases são alguns exemplos de uma vasta gama de enzimas produzidas por estes microrganismos e que encontram-se disponíveis comercialmente (Corrêa et al. 2014).

Das 32 espécies de fungos isoladas, 28 foram coletadas no solo, 3 nas raízes, 1 nos caules e nenhuma nas folhas ou frutos. Muitos estudos são realizados com microrganismos endófitos, aqueles que habitam o interior das plantas (Souza et al. 2004; Luz et al. 2006; Cuzzi et al. 2011); porém, raramente encontra-se algum estudo sobre microrganismos que vivem na superfície de vegetais.

Estudos que visam o isolamento de substâncias a partir de microrganismos são comuns. Os produtos buscados por estas pesquisas são diversos, como carotenoides (Valduga et al. 2009), antibióticos (Davet et al. 2009) e enzimas (Uenojo e Pastore 2006; Duarte et al. 2013). Isso acontece porque os microrganismos são comprovadamente produtores de diversos metabólitos de interesse, além de serem facilmente encontrados em todos os ambientes. Assim, a natureza como um todo representa uma fonte inesgotável de produtos de interesse biotecnológico.

De acordo com Kasana et al. (2011), para realizar um *screening* quanto à produção de proteases extracelulares por microrganismos, alguns métodos foram desenvolvidos. Nestes testes, os quais são realizados em placas de Petri, a produção de protease é observada diretamente por meio de alterações na aparência do substrato que suplementa os meios de cultivo.

No presente estudo, a determinação qualitativa da atividade proteolítica foi realizada utilizando-se *skim Milk-ágar*. Quando microrganismos produtores de enzimas proteolíticas são cultivados neste meio, ocorre a formação de uma zona de hidrólise no ágar, representada por um halo transparente. Este fenômeno está relacionado com a quantidade de proteases produzida (Lantz e Ciborowski 1994; Priya e Vasuki 2014). O halo é visualizado em volta das colônias que crescem nestas placas de ágar contendo proteínas do leite. Porém, na realização do presente trabalho, tal metodologia foi adaptada, pois ao cultivar os fungos diretamente no *skim Milk-ágar* poderia haver ausência de crescimento fúngico pela carência de nutrientes no meio ou o fungo poderia crescer antes da formação do halo, prejudicando a visualização do mesmo. Por este motivo, os fungos foram cultivados em meio líquido (caldo Sabouraud) e apenas os seus extratos filtrados foram usados para detectar a produção de proteases por meio das cavidades.

Priya e Vasuki (2014) investigaram a capacidade proteolítica de 3 bactérias do gênero *Bacillus* sp., isoladas a partir de uma amostra de solo, por meio de dois *screenings*: no primeiro, cultivaram os microrganismos em placas contendo *skim Milk-ágar*; no segundo, utilizaram o extrato filtrado do cultivo do isolado que produziu o maior halo transparente no *screening* anterior, apenas para comprovar qualitativamente a produção de proteases. O desenvolvimento de zona clara em torno do poço foi observado, supondo que ambos os métodos qualitativos podem ser equivalentes.

Várias espécies de fungos (*Aspergillus flavus*, *A. melleu*, *A. niger*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Fusarium graminearum*, *Penicillium griseofulvin*, *Scedosporium apiosermum*) e de bactérias (*Bacillus licheniformis*, *B. firmus*, *B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. proteolyticus*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*) são comprovadamente produtoras de proteases (Ellaiah et al. 2002; Ravikumar et al. 2012).

A maioria dos fungos coletados neste estudo (n=28; 78,13%) pertencem ao gênero *Aspergillus* sp. Espécies deste gênero, como *A. niger* e *A. oryzae*, são conhecidos por possuírem uma habilidade natural para secretar grandes quantidades de proteínas, como enzimas hidrolíticas (principalmente amilases, proteases e celulasas), para o meio de crescimento (Nevalainen et al. 2005).

Proteases extracelulares obtidas a partir de fungos do gênero *Aspergillus* sp. geralmente são ácidas ou alcalinas e possuem um alto valor comercial devido às suas diversas aplicações, como na produção de detergentes, produtos para fins diagnóstico, nas indústrias farmacêutica e alimentícia, no tratamento do couro, na recuperação da prata, na gestão de resíduos, dentre outras (Rao et al. 1998).

Até o presente momento, apenas um estudo, realizado no ano de 2009 por Morya e Yadav, avaliou a produção de proteases por *A. tubingensis*. As cepas utilizadas foram isoladas do solo de uma floresta localizada na Índia. O *screening* qualitativo para a atividade proteolítica foi realizado em meio sólido acrescido de *skim Milk*. A produção de proteases foi realizada em fermentação submersa com meio Czapek, acrescido de extrato de levedura, peptona, glicose e alguns elementos-traço. O cultivo foi realizado sem agitação, a 30 °C, durante 96 horas. Após ser filtrado e centrifugado, o sobrenadante foi usado como extrato bruto da enzima. A quantificação das proteases foi realizada usando tirosina. A máxima quantidade de proteases produzida foi 60,55 U.mL⁻¹.

As divergências metodológicas podem justificar a diferença entre as quantidades de proteases obtidas em ambos os estudos. Primeiramente, estes não são comparáveis em termos de quantificação de proteases, visto que a metodologia utilizada é diferente. A forma em que se dá a fermentação submersa também é um diferencial. Enquanto o estudo anterior usa incubação estagnada, este foi realizado em agitador rotatório, com agitação constante e ininterrupta, o que pode estimular a migração das proteases para o meio extracelular, tornando-as disponíveis no meio e facilitando a sua captura. Este trabalho também se torna mais completo por ter sido realizado durante um período mais extenso e por determinar a faixa de tempo em que a produção de proteases é maior, ao passo que o estudo anterior só avaliou o tempo final de cultivo.

O valor do pH do meio de cultivo exerce influência sobre a produção e a atividade enzimáticas. Em 1972, ao investigar o efeito do pH inicial na formação

de proteases usando cerca de 230 cepas de fungos, Kamada et al. concluíram que o pH inicial é um fator muito importante para a formação de proteases extracelulares, tendo em vista que a acidez do meio é fundamental neste processo, já que existem proteases ácidas, neutras e alcalinas. Já Fleuri e Sato (2008) concluíram que dentre os parâmetros avaliados em seu estudo, o pH foi o único que exerceu algum efeito estatisticamente significativo sob a produção de proteases pelo actinomiceto *Cellulosimicrobium cellulans*, pois um incremento desta variável induziria uma diminuição da produção de protease. A temperatura e a agitação dos frascos não apresentaram nenhum efeito estatisticamente significativo no referido estudo.

No presente trabalho, a composição e o pH inicial do meio de cultivo foram mantidos, pois objetivou-se avaliar apenas o perfil da produção de proteases pelo fungo *A. tubingensis* nas condições analisadas. Como foi observado anteriormente (Tabela 2 e Figura 7), nas primeiras 24 horas de cultivo, o valor do pH foi de 3,40. Este valor decaiu aproximadamente 1,7 vezes em relação ao valor inicial (5,61). No período de 144 horas de cultivo, momento em que a atividade proteolítica é máxima (29,46 U.mL⁻¹), o pH foi de 3,80. A partir das 192 horas de cultivo, podemos observar o aumento de pH (4,84) e o decaimento da atividade enzimática (2,93 U.mL⁻¹). Esses dados corroboram com a potencial produção de proteases ácidas pelo fungo em estudo. De acordo com De Moraes (1984), na ausência de meio tamponado, o valor do pH cai durante as primeiras fases de fermentação e este fenômeno pode ser tido como um reflexo da atividade do fungo, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H⁺ durante a geração de ATP pela respiração.

Geralmente, observa-se que o pH dos meios de cultivo tende a cair ao longo dos mesmos. Bidochka e Khachatourians (1988) sugeriram que a queda nos níveis de pH observada na produção de proteases extracelulares pelo fungo *Beauveria bassiana* ocorreu devido ao acúmulo de metabólitos ácidos, como o ácido oxálico. O aumento da acidez do meio também foi observado por Dias et al (2008), que utilizaram um meio não tamponado na produção de proteases. No presente trabalho, apesar de haver um decréscimo acentuado no pH durante as primeiras 192 horas de cultivo, o mesmo aumentou significativamente nas últimas 48 horas (de 4,84 para 7,10), discordando dos resultados obtidos nos

estudos citados anteriormente. Tal evento necessita de uma investigação mais aprofundada, tendo em vista que coincide com o decréscimo acentuado da atividade proteolítica do fungo, porém não se sabe se há uma relação direta entre os fatos.

Observou-se, também, que entre os períodos 168 a 192 horas, a atividade proteolítica cai aproximadamente 9 vezes (de 26,55 para 2,93 U.mL⁻¹), ao passo que o fungo mantém seu crescimento ativo. Resultados semelhantes foram encontrados por Chauhan e Gupta (2004), os quais afirmam que o decaimento na produção de proteases após períodos prolongados de incubação pode ocorrer devido à autólise ou atividade proteolítica de outras proteases sob condições de escassez de substrato. Portanto, o fato de o fungo continuar crescendo até o final do cultivo sugere que o substrato do meio pode ter se esgotado, fazendo com que o fungo consumisse as enzimas do meio como uma alternativa. Porém, para comprovar tal sugestão, seria necessário quantificar a glicose (substrato) em cada amostra coletada.

Dos 32 fungos coletados, 3 pertencem ao gênero *Cladosporium* sp. (12,5%), que são fungos deuteromicetos de distribuição mundial (Potin et al. 2004; Qi et al. 2009), predominantes nas regiões tropicais e subtropicais (de Hoog et al. 2000; Ding et al. 2008). Este gênero inclui várias espécies saprofíticas associadas a plantas, sendo que algumas são patogênicas. Algumas espécies possuem aplicações comprovadas. Ding et al. (2008) determinaram que a espécie de *Cladosporium* sp. estudada em seu trabalho possui potencial antimicrobiano frente a algumas cepas de bactérias e fungos. Kumar e Manonmani (2013) isolaram uma espécie de *Cladosporium* sp. capaz de produzir L-asparaginase. Chinaglia et al. (2014) caracterizaram lipases extracelulares produzidas por *C. cladosporioides*. Porém, além destas aplicações, pode-se destacar que a produção de proteases por *Cladosporium* sp. já foi estudada por Murao et al. (1972), os quais avaliaram as condições de cultivo, os processos de purificação e algumas propriedades de uma protease ácida produzida por tal cepa. Já em 1984, Robertsen concluiu que o fungo *Cladosporium cucumennum* produz uma protease alcalina extracelular quando cultivado em um meio líquido contendo pectina e gelatina.

As micotoxinas são metabólitos secundários tóxicos que surgem de forma natural em produtos agroalimentares em todo o mundo. As mais relevantes para

a segurança sanitária de alimentos são as aflatoxinas, a ocratoxina A e as fumonisinas. São produzidas principalmente por espécies que pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, sendo tóxicas para humanos e animais, quando ingeridas em pequenas quantidades. Podem ser carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas, citotóxicas, neurotóxicas, nefrotóxicas, estrogênicas e imunossupressoras (Soares et al. 2013).

Atualmente, sabe-se que algumas espécies que pertencem à Seção Nigri ou dos “*Aspergillus negros*” são comprovadamente produtoras de toxinas, como a ocratoxina A e a fumonisina B2. O *A. tubingensis* é um fungo membro da Seção Nigri (grupo do *Aspergillus niger*). Os *Aspergillus* deste grupo encontram-se largamente distribuídos na natureza e são fungos deterioradores comuns em alimentos.

Para garantir a segurança da manipulação, a cepa de *A. tubingensis* estudada neste trabalho foi investigada quanto à produção de micotoxinas como a ocratoxina A e fumonisina B2, sendo considerada não-produtora. Dentre as 16 espécies de *Aspergillus* section Nigri estudadas por Samson et al. (2004) e Vries et al. (2005), somente quatro espécies foram confirmadas como produtoras de OTA: *A. carbonarius*, *A. niger sensu stricto*, *A. lacticoffeatus* e *A. sclerotioniger*. As demais espécies testadas (*A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. costaricaensis*, *A. ellipticus*, *A. foetidus*, *A. heteromorphus*, *A. homomorphus*, *A. japonicus*, *A. piperis*, *A. tubingensis* e *A. vadensis*) algumas das quais descritas na literatura como produtoras de OTA, não foram confirmadas como produtoras. Estes dados confirmam os trabalhos de Samson et al. (2004) e Frisvad et al. (2011), que não encontraram cepas de *A. tubingensis* produtoras de ocratoxina A e fumonisina B2.

Em 2007, Frisvad et al. relataram pela primeira vez a produção de fumonisina B2 por *A. niger*. Até então a produção de fumonisina havia sido relatada apenas em *Fusarium verticillioides*, que é comum em milho, e em algumas outras espécies do gênero *Fusarium* sp..

A ocratoxina A (OTA) é uma micotoxina nefrotóxica, que se estiver presente nos alimentos, pode causar danos à saúde do consumidor. A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC, 1993) classificou a OTA como um agente possivelmente carcinogênico para humanos (grupo 2B). As fumonisinas estão entre as micotoxinas mais importantes na segurança dos

alimentos e de rações. A fumonisina B1 é a fumonisina mais intensivamente estudada, mas quando comparada à B2, esta última é mais citotóxica que a B1 (Gutleb et al. 2002).

O estudo da produção de proteases por microrganismos tem uma importância particular em virtude das vantagens em utilizar tais seres como fonte destas enzimas, as quais possuem ampla aplicação biotecnológica e industrial. Ademais, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a espécie *A. tubingensis*, isolada no semiárido paraibano, representa uma boa produtora de proteases. Porém, novos estudos são necessários para otimizar a produção, além de classificar e caracterizar a enzima afim de torná-la industrialmente aplicável. Por fim, também se faz necessária a identificação das demais espécies fúngicas isoladas neste estudo, já que trabalhos anteriores indicam que outras espécies de *Aspergillus* sp. e *Cladosporium* sp. são produtores de enzimas proteolíticas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à pesquisadora Marta Hiromi Taniwak do Instituto de Tecnologia de Alimentos de São Paulo pela realização dos testes de investigação da produção de ocratoxina A e fumonisina B2 pelo *A. tubingensis*. Agradecem também à FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro para realização deste trabalho; à CAPES, pela concessão de bolsa de estudo e à Universidade de São Paulo, local de realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alnahdi HS (2012) Isolation and screening of extracellular proteases produced by new Isolated *Bacillus* sp. J App Pharm Sci 2(9):71-74. doi: 10.7324/JAPS.2012.2915.

Araújo JMF, Lima JS, Silva Neto FL, Sá HWO, Pereira JO, Giancoli ACH (2009) Isolamento e Identificação de Fungos Filamentosos Endofíticos de *Piper marginatum* Jacq. Registros da 61ª Reunião Anual da SBPC. ISSN 2176-1221.

Archer DB (2000) Filamentous fungi as microbial cell factories for food use. Curr Opin Biotechnol 11:478-483. doi:10.1016/S0958-1669(00)00129-4.

Balachandran C, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S (2012) Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). *Asian Pac J Trop Biomed* 2(1):1138-S1146. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60195-6.

Bennett JW (1998) *Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology*. *J Biotechnol* 66:101-107. doi: 0168-1656/98/\$.

Bidochka MJ, Khachatourians GG (1988) Regulation of extracellular protease in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Experimental Mycology*, 12(2):161-168. doi:10.1016/0147-5975(88)90005-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Documento de referência para a Detecção e Identificação dos Fungos de Importância Médica. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 24p. Brasília, 2004. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_7_2004.pdf> Acesso em 12 de janeiro de 2015.

Busto MD, Ortega N, Perez-Mateos M (1995) Induction of β -glucosidase in fungal and soil bacterial cultures. *Soil Biol Biochem* 27:949-954. doi: 10.1016/0038-0717(94)00233-Q. doi:10.1016/0038-0717(94)00233-Q.

Castellani A (1939) Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg*24:270276-6.

Charney J, Tomarelli RM (1947) A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. *J Biol Chem* 171:501-505.

Chauhan B, Gupta R (2004) Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochem* 39:2115–2122. doi: 10.1016/j.procbio.2003.11.002.

Chinaglia S, Chiarell LR, Maggi M, Rodolfi M, Valentini G, Picco AM (2014) Biochemistry of lipolytic enzymes secreted by *Penicillium solitum* and *Cladosporium cladosporioides*. *Biosci Biotechnol Biochem* 78(2):245-54. doi: 10.1080/09168451.2014.882752.

Colla LM, Primaz AL, Lima M, Bertolin TE, Costa JAV (2008) Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciênc Agrotec* 32(3): 809-813.

Corrêa RCG, Rhoden SA, Mota TR, Azevedo JL, Pamphile JA, de Souza CGM, Polizeli MLTM, Bracht A, Peralta RM (2014) Endophytic fungi: expanding the arsenal of industrial enzyme producers. *J Ind Microbiol Biotechnol* 41(10):1467-78. doi: 10.1007/s10295-014-1496-2.

Cuzzi C, Link S, Vilani A, Onofre SB (2011) Enzimas extracelulares produzidas por fungos endofíticos isolados de *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *GI Sci Technol* 4(2):47-57.

Davet A, Virtuoso S, Dias JFG, Miguel MD, Oliveira AB, Miguel OG (2009) Atividade antibacteriana de *Cereus jamacaru* DC, Cactaceae. Rev Bras Farmacogn 19(2B): 561-564. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000400009>.

Da Silva M, Passarini MRZ, Bonugli RC, Sette LD (2008) Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. Environ Technol 29:1331-1339. doi: 10.1080/09593330802379466.

Dekker, M. (2003) Handbook of Fungal Biotechnology. Dilip K. Arora, New York.

De Hoog GS, Queiroz-Telles F, Haase G, Fernandez-Zeppenfeldt G, Angelis DA, van den Ende A, Matos T, Peltroche-Llacsahuanga H, Pizzirani-Kleiner AA, Rainer J, Richard-Yegres N, Vicente V, Yegres F (2000) Black fungi: clinical and pathogenic approaches. Med Mycol 38 Suppl 1:243-50.

De Moraes SMF (1984) Tolerância alcoólica, atividade fermentativa e permeabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae*. Dissertação, Universidade de São Paulo.

Dias BA, Neves PMOJ, Furlaneto-Maia L, Furlaneto MC (2008) Cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the presence of coffee berry borer cuticle. Braz J Microbiol 39:301-306. doi: 10.1590/S1517-83822008000200019.

Ding L, Qin S, Li F, Chi X, Laatsch H (2008) Isolation, Antimicrobial Activity, and Metabolites of Fungus *Cladosporium* sp. Associated with Red Alga *Porphyra yezoensis*. Curr Microbiol 56(3):229-35. doi: 10.1007/s00284-007-9063-y.

Duarte AWF, Dayo-Owoyemi I, Nobre FS, Pagnocca FC, Chaud LCS, Pessoa Jr A, Felipe MGA, Sette LD (2013) Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. Extremophiles 17:1023–1035. doi: 10.1007/s00792-013-0584.

Ellaiah P, Adinarayana K, Bhavani Y, Padmaja P, Srinivasulu B. (2002) Optimization of process parameters for glucoamylase production under solid state fermentation by a newly isolated *Aspergillus* species. Process Biochem 38(4):615-620. doi: 10.1016/S0032-9592(02)00188-7.

Filtenborg O, Frisvad JC, Svendsen JA (1983) Simple screening method for molds producing intracellular mycotoxins in pure cultures. Appl Environ Microbiol 45: 581-585. doi: 0099-2240/83/020581-05\$02.00/0.

Fleuri LF, Sato HH (2008) Estudo da influência de diferentes parâmetros na produção de enzimas líticas. Ciênc Tecnol Aliment 28(2):299-310. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612008000200006>.

Frisvad JC, Larsen TO, Thrane U, Martin Meijer M, Varga J, Samson RA, Nielsen KF (2011). Fumonisin and ochratoxin production in Industrial *Aspergillus niger* strains. PlosOne 6:1-6. doi: 10.1371/journal.pone.0023496.

Frisvad, JC, Smedsgaard J, Samson RA, Larsen TO, Thrane, U (2007) Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. J Agric Food Chem 55: 9727-9732. doi: 10.1021/jf0718906.

Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and ruts. Mol Ecol 2(2):113-118.

Gutleb A, Morrison E, Murk, AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium strains*: a review. Environ Toxicol Pharmacol 11: 309-320. doi: 10.1016/S1382-6689(02)00020-0.

Haddar A, Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Frikha F, Nasri M, Kamoun AS (2010) Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. J Biosci Bioeng 110:288–294. doi: 10.1016/j.jbiosc.2010.03.015.

Hamayun M, Khan AS, Khan AL, Rehman G, Kim YH, Iqbal I, Hussain J, Sohn EY, Lee IJ (2010) Gibberellin production and plant growth promotion from pure cultures of *Cladosporium* sp. MH-6 isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.). Mycologia, 102(5):989–995. doi: 10.3852/09-261.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (1993) Ochratoxin A. In IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, v.56. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p.489-521.

Iwashita, I (2002) Recent Studies of Protein Secretion by Filamentous Fungi. J Biosci Bioeng 94:530-535. doi: 10.1016/S1389-1723(02)80191-8.

Kapnoor S, Mulimani, VH (2010) Production of α -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through Solid-state Fermentation and its Application in Soymilk Galactooligosaccharide Hydrolysis. Braz Arch Biol Technol 53(1):211-218. doi: 10.1590/S1516-89132010000100026.

Kamada M, Oda K, Murao S (1972) The purification of the extracellular acid protease of *Rhodotorula glutinis* K-24 and its general properties. Agric Biol Chem 36:1095-1101. doi: 10.1080/00021369.1972.10860377.

Kasana RC (2010) Proteases from psychrotrophs: An overview. Crit Rev Microbiol 36(2):134-145. doi: 10.3109/10408410903485525.

Kimura, M (1980) A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mol Evol 16: 111-120. doi: 0022--2844/80/0016/0111/\$02.00.

Koblitz MGB (2010) Bioquímica dos alimentos: teoria e prática. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Kumar NSM, Manonmani HK (2013) Purification, characterization and kinetic properties of extracellular L-asparaginase produced by *Cladosporium* sp. World J Microbiol Biotechnol 29(4):577-87. doi: 10.1007/s11274-012-1213-0.

Lantz MS, Ciborowski P (1994) Zymographic techniques for detection and characterization of microbial proteases. Method Enzymol 235:563-594.

Luz JS, Silva RLO, Silveira EB, Cavalcante UMT (2006) Atividade enzimática de fungos endofíticos e efeito na promoção do crescimento de mudas de maracujazeiro-amarelo. Caatinga 19(2):128-134.

Morya V, Yadav D (2009) Production and partial characterization of neutral protease by an indigenously isolated strain of *Aspergillus tubingensis* NIICC-08155. The Internet Journal of Microbiology 8(1).

Murao BS, Funakoshi S, Oda K (1972) Purification, Crystallization and Some Enzymatic Properties of Acid Protease of *Cladosporium* sp. No. 45-2. Agr Biol Chem 36(8):1327-1333.

Nevalainen KM, Te'o VS, Bergquist PL (2005) Heterologous protein expression in filamentous fungi. Trends Biotechnol 23:468-474. doi: 10.1016/j.tibtech.2005.06.002.

Pereira CI, Crespo MT, Romao MV (2001) Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*. Int J Food Microbiol (68)3:211-216. doi: 10.1016/S0168-1605(01)00534-7.

Peterson SW, Vega FE, Posada F, Nagai C (2005) *Penicillium coffeae*, a new endophytic species isolated from a coffee plant and its phylogenetic relationship to *P. fellutanum*, *P. thiersii* and *P. brocae* based on parsimony analysis of multilocus DNA sequences. Mycologia 97(3):97659-97666. doi: 10.3852/mycologia.97.3.659.

Porto, ALF, Campos-Takaki, GM, Lima Filho, JL (1996) Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on soy bean flour medium. Appl Biochem Biotech:60:115-122. doi: 10.1007/BF02788066.

Potin O, Veignie E, Rafin C (2004) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. FEMS Microbiol Ecol 51(1):71-78. doi: 10.1016/j.femsec.2004.07.013.

Priya R, Vasuki R (2014) Screening and molecular characterization of *Bacillus* sp PR01 for the production of protease enzyme. Int Res J Pharm 5(3):191-194. doi: 10.7897/2230-8407.050340.

Qi SH, Xu Y, Xiong HR, Qian PY, Zhang S (2009) Antifouling and antibacterial compounds from a marine fungus *Cladosporium* sp. F14. *World J Microbiol Biotechnol* 25:399–406. doi: 10.1007/s11274-008-9904-2.

Rao MB, Tanksale, AM, Ghatge, MS, Deshpande, VV (1998) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol R* 62:597-635. doi: 1092-2172/98/\$04.0010.

Ravikumar G, Gomathi D, Kalaiselvi M, Uma C (2012) A protease from the medicinal mushroom *Pleurotus sajor-caju*; production, purification and partial characterization. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(1):S411-S417. doi: 10.1016/S2221-1691(12)60198-1.

Riddel RW (1950) Permanente stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycology* 42:265-270. doi: 10.2307/3755439.

Robertsen B (1984) An alkaline extracellular protease produced by *Cladosporium cucumerinum* and its possible importance in the development of scab disease of cucumber seedlings. *Physiol Plant Pathol* 24:83-92.

Samson RA, Houbraken JAMP, Kuijpers AFA, Frank JM, Frisvad JC (2004) New ochratoxin A or sclerotium producing species of *Aspergillus* section Nigri. *Studies Mycol* 50:45-61.

Santos TC, Rocha TJO, Oliveira AC, Abreu Filho G, Franco M (2013) *Aspergillus niger* como produtor de enzimas celulolíticas a partir do farelo de cacau (*Theobroma cacao*). *Arq Inst Biol* 80(1):65-71. doi: 10.1590/S1808-16572013000100010.

Simões, MLG, Tauk-Tornisielo SM (2005) Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo em diferentes fontes de carbono de fungos filamentosos isolados de solo de área de caatinga. *HOLOS Environment*, 5(2):94-103.

Soares C, Calado T, Venâncio A (2013) Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. *Rev Iberoam Micol* 30(1):9–13. doi: 10.1016/j.riam.2012.05.002.

Schoberle TJ, Nguyen-Coleman CK, May, GS (2013) Plasmids for increased efficiency of vector construction and genetic engineering in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* 58–59:1–9. doi: 10.1016/j.fgb.2013.07.002.

Souza AQL, Souza ADL, Astolfi Filho S, Pinheiro MLB, Sarquis MIM, Pereira JO (2004) Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (Aubl.) Rich e *Strychnos cogens* Benth. *Acta Amaz.* 34(2):185-195. doi: 10.1590/S0044-59672004000200006.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24(8):1596-1599. doi: 10.1093/molbev/msm092.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 24:4876–4878. doi: 10.1093/nar/25.24.4876.

Uenojo M, Pastore GM (2006) Isolamento e seleção de microrganismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciênc Tecnol Aliment* 26(3):509-515.

Valduga E, Tatsch PO, Tiggemann L, Treichel H, Toniazzo G, Zeni J, Di Luccio M (2009) Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. *Quím Nova* 32(9):2429-2436. doi: 10.1590/S0100-40422009000900036.

Visconti A, Solfrizzo M, De Girolamo A (2001) Determination of fumonisins B1 and B2 in corn and corn flakes by liquid chromatography with immunoaffinity column cleanup: Collaborative study. *J Offic Assoc Analyt Chem Internat* 84: 1828-1838.

Vries RP, Frisvad JC, Van de Vondervoort PJ, Burgers K, Kuijpers AF, Samson RA, Visser J (2005) *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black aspergilli. *Antonie Leeuwenhoek* 87:195–203. doi: 10.1007/s10482-004-3194-y.

Zimmer KR, Borré GL, Trentin DS, Woicickoski Júnior C, Frasson AP, Graefi AA, Gomes P, Macedo AJ (2009) Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico. *Revista Liberato* 10:123-137.

NOTA DE ESCLARECIMENTO

No início desta pesquisa, esperava-se isolar fungos filamentosos do semiárido paraibaino, fazer um *screening* da produção de proteases pelos mesmos e dar continuidade com apenas com um dos fungos, almejando otimizar as condições de cultivo (meio de cultura, tempo, pH e temperatura) até encontrar aquela que oferecesse a produção de uma maior quantidade de proteases. Por fim, prosseguir-se-ia com testes em biorreator e identificação da classe de proteases.

Porém, o melhor produtor da enzima de interesse foi identificado como *Aspergillus tubingensis* que, como foi relatado, pertence à Seção Nigri do referido gênero e seria um provável produtor de micotoxinas. Em parceria com o Instituto de Tecnologia de Alimentos de São Paulo, foram realizados testes para investigar se tal microrganismo seria produtor de ocratoxina A e fumonisina B2. Todavia, em virtude do tempo necessário para a realização dos referidos testes (que seriam de suma importância para garantir segurança na manipulação da cepa), foi necessário interromper a pesquisa, já que a possibilidade de trabalhar com uma espécie possivelmente tóxica era totalmente inviável. Como o resultado desta investigação foi liberado às vésperas da apresentação deste trabalho, foi necessário buscar uma alternativa que fornecesse resultados publicáveis e, portanto, iniciou-se uma pesquisa envolvendo outro microrganismo.

Assim, buscando encontrar resultados satisfatórios, decidiu-se continuar trabalhando com a produção de proteases por microrganismos, porém utilizando a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07. Trata-se de um microrganismo já investigado pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. Anteriormente, tal grupo investigou a produção de proteases pela mesma, usando agitador rotatório. Porém, nenhum trabalho foi realizado com o mesmo propósito, porém usando biorreatores de bancada. Assim, o Capítulo 3 foi escrito a partir da avaliação da produção de proteases pela *R. mucilaginosa* L07 em biorreator.

Capítulo 3:
Levedura da Antártida

Resumo

Os microrganismos possuem grande diversidade metabólica, a qual é explorada há muitos anos visando a obtenção de produtos biotecnológicos. As enzimas são produtos de alto valor agregado, o que desperta a realização de pesquisas com o intuito de obtê-las. As proteases, enzimas utilizadas nas indústrias de fármacos, alimentos e outros produtos respondem por cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de proteases pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07 em biorreator. Tal microrganismo, oriundo da Antártida, foi cultivado em biorreator, seguindo condições pré-estabelecidas em experimentos realizados em agitador rotatório. Os cultivos procederam-se em Caldo Sabouraud, a 25 °C, por 72 h, havendo variação na agitação e na aeração. Foram avaliados os parâmetros: crescimento celular (biomassa), substrato (glicose e proteínas totais), pH e produção de proteases (atividade proteolítica). O maior valor de atividade obtido foi de 124,88 U.mL⁻¹, com agitação de 500 rpm e aeração de 1,0 vvm. Os resultados mostraram que o fornecimento de oxigênio influencia positivamente na atividade proteolítica, mas quando há saturação do meio, o valor da atividade é máximo dentro das condições testadas. A atividade enzimática aumentou de 33,36 para 124,88 U.mL⁻¹, em agitador rotatório e biorreator, respectivamente. A biomassa também cresceu com o aumento do fornecimento de oxigênio. Houve pequena acidificação dos meios em todos os cultivos. Conclui-se que o impacto do fornecimento de oxigênio em cultivos da *R. mucilaginosa* L07 foi positivo para a produção de proteases, pois observou-se que a mesma aumentou em quase quatro vezes quando a levedura foi cultivada em biorreator.

Palavras-chave: *Rhodotorula mucilaginosa*; proteases; biorreator; parâmetros cinéticos; otimização.

1. INTRODUÇÃO

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente, nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (CASTRO et al., 2004).

As enzimas podem ser de origem animal, vegetal e microbiana, sendo esta última a fonte mais recorrida na geração de diferentes produtos por processos fermentativos, dentre elas enzimas de aplicação biotecnológica. As vantagens da utilização dos microrganismos incluem menores custos na sua obtenção e possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais (CARVALHO et al., 2005; BARATTO et al., 2011), além da facilidade de crescimento e adaptação em diferentes ambientes, diversidade bioquímica e manipulação genética (KAPNOOR; MULIMANI 2010).

A diversidade de microrganismos existentes justifica a busca por novos produtores de enzimas de interesse industrial (CARVALHO et al., 2005). Os microrganismos ocupam praticamente todos os nichos vivos e não-vivos da Terra, dentre eles fontes hidrotermais, sedimentos de rochas profundas, desertos, bem como ambientes marinhos (STROBEL, 2003). Vários relatos afirmam que mais de 90% dos ambientes marinhos possuem uma ampla diversidade de vida microbiana, a qual compreende protistas, bactérias, fungos e algas unicelulares (ENGEL et al., 2002; MAIANGWA et al. 2014; SINGH; GARG, 2014). Neste contexto, nichos ecológicos pouco explorados, como o continente antártico, têm recebido grande atenção devido ao potencial dos recursos genéticos microbianos que habitam estes ecossistemas (SHIVAJI; PRASAD, 2009; DUARTE et al., 2013), incluindo a biodiversidade das espécies e resistência às condições climáticas e geográficas, além da diversidade metabólica complexa e biomoléculas únicas provavelmente desenvolvidas pela necessidade de resistência às condições desfavoráveis de seu ambiente de origem.

No contexto da produção de proteases, os microrganismos recebem destaque em virtude das vantagens em utilizá-los em processos biotecnológicos. Proteases microbianas são utilizadas em muitas aplicações industriais e têm sido

amplamente exploradas pelas indústrias alimentares, produtos lácteos e detergentes desde os tempos antigos (THERON; DIVOL, 2014). Ademais, microrganismos em geral podem crescer rapidamente com alta produtividade e sem problemas de sazonalidade (JIANG et al., 2005; MÉNDEZ et al., 2011), independentemente de fatores externos, já que em ambientes laboratoriais é possível controlar as condições de cultivo, garantindo a produção do metabólito de interesse (MAPARI et al., 2010).

Proteases extracelulares de leveduras são também relevantes em processos biotecnológicos (estabilização de cervejas e vinhos, alimentos, produtos farmacêuticos e outros) e vários gêneros já foram identificados como produtores de proteases, como o gênero *Rhodotorula* (OGRYDZIAK, 1993). Algumas leveduras deste gênero se caracterizam por produzir carotenoides característicos, tais como β -caroteno, toruleno e torularrodina, em várias proporções (PERRIER et al., 1995; AKSU; EREN, 2005).

A espécie *Rhodotorula mucilaginosa* é uma levedura que pode ser encontrada em diversos ambientes, como solos, lagos, água do mar e em produtos laticínios, colonizando plantas, seres humanos e outros mamíferos, bem como o ar (CHUNLI et al., 2008). É comprovadamente produtora de carotenoides, sendo o toruleno, um carotenoide interessante para aplicações industriais, o principal pigmento produzido por tal levedura (ZOZ et al., 2014). Porém, com relação à produção de proteases, resultados positivos de *screening* quanto à atividade proteolítica (DUARTE et al., 2013) foram encontrados na literatura, mas o perfil de produção destas enzimas pela *R. mucilaginosa* L07 ainda não foi avaliado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS INDUSTRIAIS

A partir do desenvolvimento da indústria de antibióticos nas décadas de 1940 e 1950, os processos biotecnológicos industriais apresentaram rápido progresso. Inúmeras substâncias como enzimas, peptídeos e aminoácidos, ácidos orgânicos, fármacos, vitaminas, dentre outros produtos, são produzidas hoje em dia por processos bioquímicos, que muitas vezes são a única alternativa para sua obtenção, ou se mostram extremamente vantajosos quando comparados a rotas envolvendo sínteses químicas (CERRI, 2009).

A biotecnologia reúne um conjunto de técnicas que abrange conhecimentos científicos biológicos e tecnológicos, aplicáveis a procedimentos que envolvem organismos e seus derivados. Combina protocolos de pesquisa já existentes com novos processos científicos derivados de disciplinas como Bioquímica, Biologia Molecular e Celular, Engenharia Química, Ciências da Computação, Ciências Materiais, Genética, Imunologia, Fisiologia, Microbiologia, dentre outras (KREUZER; MASSEY, 2002). Permite cultivar microrganismos para produzir e desenvolver produtos para setores variados, como a agricultura, alimentação, energia, eletrônica, meio ambiente, pecuária, química e medicina (SILVEIRA et al., 2002).

Bon et al. (2008) afirmam que o desenvolvimento da biotecnologia é vital para o futuro do Brasil, pois resulta em processos de baixo impacto ambiental, desde que utilize os recursos naturais de maneira sustentável com preservação dos ecossistemas. Sendo assim, o Brasil tende a ser uma futura potência mundial por possuir a maior biodiversidade do planeta, desde que seja capaz de gerir esse imenso patrimônio, implementando políticas de incentivo às pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias que potencializem a utilização dos recursos naturais e a produção de bens de elevado valor agregado.

De acordo com Lima et al. (2001), um processo biotecnológico envolve diversas etapas que dependem da escolha da matéria-prima, da esterilização dos meios de produção e dos equipamentos. O isolamento e a seleção de microrganismos, além do melhoramento genético das cepas e a conservação das culturas puras é determinante na produtividade do processo. O cultivo em

biorreator, o controle do processo, a extração, a purificação e a formulação do produto, além do tratamento e reaproveitamento dos efluentes gerados, são etapas que influenciam diretamente o custo do produto final nos processos industriais.

Os bioprocessos industriais envolvem principalmente fermentações microbianas ou de células animais. Para desenvolver um bioprocessos produtivo, é necessário testar diversos fatores, como a composição do meio de cultivo, especialmente as fontes de carbono e nitrogênio; porém, fatores físicos, tais como temperatura, pH, tempo de incubação, agitação e densidade do inóculo também influenciam. Para fins industriais, essa otimização é fundamental para se desenvolver processos mais rápidos, a fim de reduzir o tempo e o custo da produção (KENSY et al., 2009; BALACHANDRAN et al., 2012).

2.1.1 Biorreatores:

Agitadores rotatórios, microplacas e biorreatores de bancada são comumente usados na realização de cultivos para o desenvolvimento de bioprocessos. Cultivos realizados em agitadores rotatórios são facilmente preparados e permitem que mais de uma condição seja testada em paralelo. Já as microplacas permitem um grau muito maior desse tipo de experimento. Mas sabe-se que as amostras de ambas as técnicas citadas são limitadas devido ao pequeno volume e, além do mais, poucas informações podem ser geradas. As células são submetidas a altas concentrações da fonte de carbono e o pH pode mudar durante o cultivo. Cultivos industriais permitem um controle maior das condições testadas, como pH e concentração de oxigênio dissolvido. Os sistemas de fermentação em escala de bancada atendem a esses requisitos (NEUBAUER et al., 2013).

No desenvolvimento de um processo biotecnológico, biorreatores de bancada desempenham um papel essencial para realização de experimentos de cultivo em pequena escala e na obtenção de um alto rendimento. A utilização de tais biorreatores acelera o desenvolvimento do processo, que é geralmente lento e caro (NEUBAUER et al., 2013; LATTERMANN; BÜCHS, 2015). Assim, nos últimos anos, tecnologias de alta capacidade tornaram-se bem estabelecidas em

laboratórios de pesquisa em busca de alto rendimento e para ganhar mais *insights* sobre os bioprocessos (KENSY et al., 2009).

De acordo com Dasu et al. (2003), os biorreatores são utilizados para o cultivo de microrganismos em grandes quantidades e sob condições controladas. Os biorreatores são reatores de tanques agitados, equipados com várias unidades de controle. Uma configuração básica é composta de unidades de controle automático para o pH, oxigênio, temperatura e velocidade de agitação. Todos estes sistemas de controle funcionam sem qualquer contato com o ambiente externo, evitando assim a contaminação da cultura e a liberação de, por exemplo, organismos patogênicos, além de se ter melhor controle de todo o processo de produção. A importância destes sistemas de controle torna-se evidente considerando que num bioprocessamento aeróbio, o consumo total de energia é compartilhado, em partes iguais, pela aeração, resfriamento e mistura.

Há vários modelos de biorreatores empregados em processos biotecnológicos. Porém, aqueles usualmente utilizados em cultivos de microrganismos e células, independentemente da escala, são os convencionais tanques agitados e aerados e os biorreatores pneumáticos. Estes, por sua vez, se subdividem em pneumáticos de coluna de bolhas e *airlift*.

Na indústria de fermentação, os biorreatores do tipo tanque agitado e aerado são os mais utilizados, de acordo com Charles (1985). Bustamante et al. (2013) afirmam que esta ferramenta é bastante empregada na produção de bioprodutos importantes e envolvem o cultivo aeróbio de microrganismos. Müller et al. (2012) complementam que são equipamentos laboratoriais e industriais bem estabelecidos que permitem a modelagem quantitativa da dinâmica de crescimento microbiano e da cinética enzimática *in vivo*.

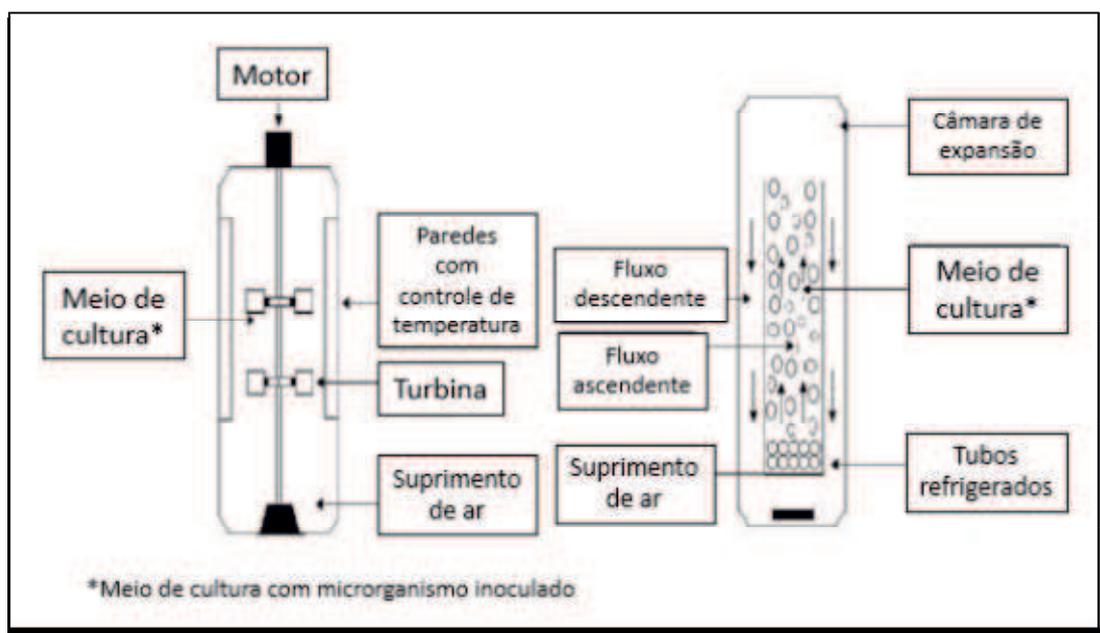
As vantagens da sua utilização englobam a correta distribuição dos nutrientes, um mínimo de morte celular resultante da adição de ácido e base concentrados para o controle de pH, uma confiável transferência de calor para o controle da temperatura e de massa para o suprimento de oxigênio e a facilidade no aumento de escala (CHARLES, 1985). A produção de enzimas por fermentação geralmente é realizada neste tipo de biorreator. Justifica-se tal procedimento pela necessidade de se obter maior homogeneização do conteúdo do biorreator e transferência de oxigênio ser mais efetiva (SCHMIDELL, 2001).

Nos biorreatores pneumáticos, tais como o de coluna de bolhas e o *airlift*, a fase líquida é agitada sob borbulhamento de ar (ou outro gás) a partir do fundo do reator, o que elimina a necessidade de um agitador mecânico. Este tipo de agitação permite alta taxa de transferência de oxigênio, que é uma condição necessária para o crescimento de microrganismos e a produção do metabólito de interesse (como enzimas) em bioprocessos aeróbicos (ESPERANÇA et al., 2014).

Por não utilizarem agitadores mecânicos, o risco de contaminação é menor nos biorreatores pneumáticos do tipo *airlift*. Ademais, o gasto com energia também é reduzido, pois estima-se que os mesmos requerem apenas um terço da energia necessária para os reatores de tanque agitado. A turbulência do fluxo produz condições favoráveis para a transferência de massa e também pode ser usada para suspender partículas sólidas (TRAGER et al., 1989; CERRI; BADINO, 2012).

A Figura 1 esquematiza os dois tipos de biorreatores mais utilizados em bioprocessos: o biorreator de tanque agitado e aerado e o pneumático do tipo *airlift*.

Figura 1. Tipos de biorreatores utilizados em bioprocessos. a) Biorreator de Tanque Agitado e b) Biorreator *airlift*



Fonte: Adaptado de Donini et al., 2010.

2.1.2 Fornecimento de oxigênio como fator limitante

Em bioprocessos que envolvem o cultivo de células aeróbias ou aeróbias facultativas, o oxigênio apresenta-se como elemento essencial no suprimento de energia para o metabolismo celular. Está envolvido no processo de reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação ao longo da glicólise, no ciclo de Krebs e no processo de produção de energia “química”, transformando as moléculas de ADP em moléculas de ATP, fundamental para o crescimento celular, síntese de produtos, transporte e outras atividades celulares (SCHMIDELL, 2001).

A aeração e a agitação em biorreatores são parâmetros essenciais para fornecer oxigênio aos microrganismos cultivados e homogeneizar o meio de cultivo, para, assim, manter a uniformidade da suspensão de microrganismos e a transferência de massa acelerada do produto metabólico (ARAUZ, 2011).

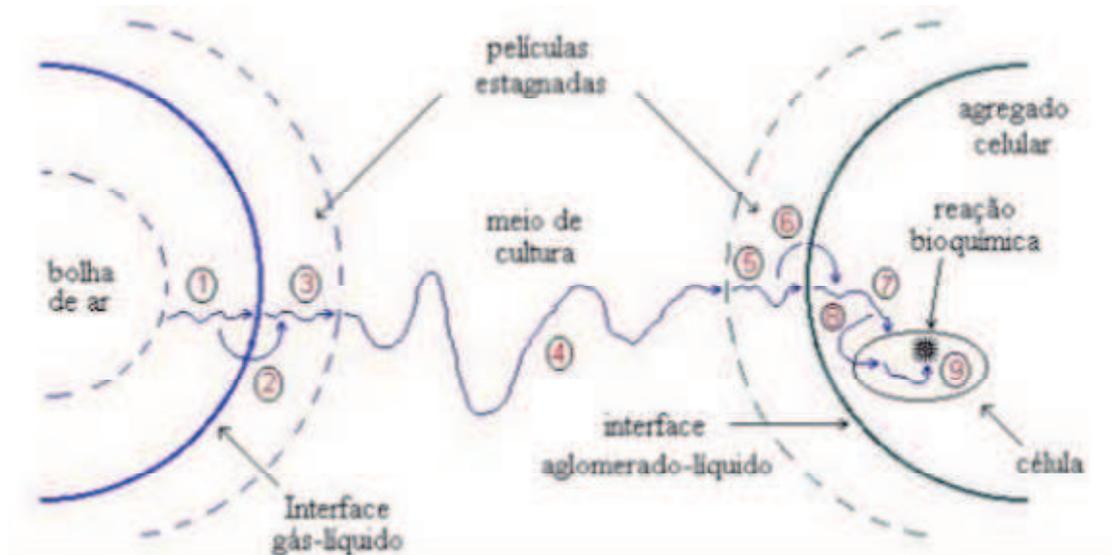
Tendo em vista que os bioprocessos aeróbicos são usualmente realizados em meio aquoso, a transferência de oxigênio torna-se um fator limitante, pois revela-se um problema crítico devido à baixa solubilidade do oxigênio em água (AMARAL et al., 2006; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; QUIJANO et al., 2010). Ademais, altas velocidades globais de respiração celular exigem grande demanda de oxigênio para garantir a viabilidade das células cultivadas (SIVAPRAKASAM et al., 2008). Em muitos sistemas aeróbios, a disponibilidade de oxigênio para os microrganismos depende da transferência de massa, bem como da velocidade com que o oxigênio dissolvido é utilizado (KARGI; MOO-YOUNG, 1985).

Assim, é de fundamental importância abordar a temática da transferência de oxigênio em processos fermentativos aeróbios, ou seja, a dissolução de oxigênio no meio de cultura para que o microrganismo possa exercer suas atividades. O transporte de oxigênio desde a bolha de ar até o interior da célula é afetado e controlado por uma grande resistência a essa transferência de oxigênio e que pode ser subdividida em diversas resistências específicas. Na Figura 2, busca-se ilustrar algumas dessas possíveis resistências.

Garcia-Ochoa e Gomez (2009) afirmam que a concentração de oxigênio dissolvido em uma suspensão de microrganismos aeróbicos depende da proporção da transferência de oxigênio gás-líquido. Os mesmos autores

acrescentam que, na fase líquida, o oxigênio é transportado para as células (onde é consumido), e essa transferência ocorre na proporção de oxigênio consumido pelo microrganismo para crescimento, manutenção e produção.

Figura 2. Resistências associadas ao transporte do oxigênio de uma bolha de ar para o interior de uma célula microbiana



Fonte: BAILEY; OLLIS, 1986.

Cada resistência acima representada pode ser conceituada da seguinte maneira:

- R1:** Difusão do gás do interior da bolha até a interface gás-líquido;
- R2:** Passagem pela interface gás-líquido;
- R3:** Difusão através da película estagnada de líquido, externa à bolha;
- R4:** Transporte através do meio líquido;
- R5:** Difusão através da película estagnada externa ao agregado celular;
- R6:** Passagem pela interface película estagnada-agregado celular;
- R7:** Difusão no agregado celular;
- R8:** Passagem pela membrana celular;
- R9:** Difusão interna na célula.

Desta forma, a medida correta e/ou previsão do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) é um passo importante para projetar, operar e ampliar escala de biorreatores.

A taxa de transferência de oxigênio num biorreator depende de vários fatores, como a geometria do biorreator (tipo de biorreator, distribuidor de agitação etc.), as propriedades do líquido (viscosidade, tensão superficial etc.), e a energia dissipada no fluido, que depende da taxa de fluxo de ar, da velocidade de agitação etc. Essa transferência de massa de oxigênio pode ser descrita e analisada pelo K_La , que é o coeficiente de transferência de massa volumétrica. Ele representa um dos parâmetros mais utilizados no desenho e operação no equipamento de mistura dos biorreatores. Assim, o coeficiente desempenha um papel importante na execução, aumento de escala e economia do processo (SIVAPRAKASAM et al., 2008).

Os mesmos autores acrescentam que a transferência de oxigênio está relacionada à agitação do sistema, que também é útil para a mistura de nutrientes e para manter o sistema homogêneo. No entanto, existem limites para a velocidade de agitação devido ao consumo elevado de energia e aos danos que podem ser causados aos microrganismos. A transferência gás-líquido é, usualmente, a etapa limitante da velocidade de reações bioquímicas em escala industrial. Por esta razão, o desenho do biorreator e o aumento da escala concentram-se em fornecer ampla transferência de oxigênio ao sistema.

2.2 *Rhodotorula mucilaginosa*

O gênero *Rhodotorula* pertence ao reino Fungi, sendo classificado como basidiomiceto da família *Cryptococcaceae* (FUNG et al., 2009). *Rhodotorula mucilaginosa* é uma levedura aeróbia obrigatória, heterotrófica, não-fermentadora, produtora de altas concentrações de carotenoides e que pode utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono para seu crescimento (MOORE et al., 1989). Por exemplo, Zheng et al. (2009) concluíram que tal levedura é capaz de utilizar nitrobenzeno como uma única fonte de carbono, nitrogênio e energia sob condição aeróbica.

Nunes et al. (2013) afirmam que trata-se de uma espécie ubíqua, pois tem sido isolada em fontes ambientais variadas, incluindo solo, ar, ecossistemas aquáticos, plantas e frutas. É altamente heterogênea, com elevada variabilidade genética e fenotípica (MOLINÉ et al., 2010).

A produção de carotenoides pela levedura *R. mucilaginosa* já foi estudada anteriormente (MOORE et al., 1989; LIBKIND et al., 2004). Trata-se de um grupo de pigmentos naturais amplamente distribuídos na natureza com grande diversidade de estruturas e funções. Estes compostos têm sido amplamente utilizados como corantes nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de rações. O interesse por carotenoides tem aumentado nos últimos anos devido à sua comprovada atividade pró-vitáminica A e pela evidência de outras propriedades biológicas, tais como atividades imunomoduladoras, anticarcinogênicas, prevenção de degeneração macular e de doenças cardiovasculares (SQUINA; MERCADANTE, 2003). Moliné et al. (2010) complementam que, dentre os mais variados tipos de carotenoides, a *R. mucilaginosa* produz quatro pigmentos principais: torularodina, toruleno, γ -caroteno e β -caroteno, que são sintetizados em diferentes taxas, dependendo da cepa analisada. *R. mucilaginosa* já foi usada como um sistema modelo para estudos de fotoproteção por Moliné et al. (2010).

A *R. mucilaginosa* possui importância biotecnológica comprovada, pois é produtora de pectinases (SAHAY et al., 2013), de lipases (ZIMMER et al., 2006; POTUMARTHI et al., 2008; CHENNUPATI et al., 2009), esterases (LEE et al., 1987), cutinases (ZHANG et al., 2015) e de ácidos graxos, podendo acumular alto teor de óleo em suas células (LI et al., 2010). Porém, o perfil da produção de proteases por esta espécie ainda não foi investigado.

2.2.1 *Rhodotorula mucilaginosa* L07

O continente antártico oferece uma gama de condições climáticas extremas: temperaturas muito baixas, disponibilidade restrita de água em estado líquido, baixa precipitação anual, ciclos de congelamento e descongelamento frequentes, baixa umidade do ar, ventos fortes, sublimação e evaporação altas, e, especialmente, a alta incidência de radiação solar ultravioleta com longos períodos de escuridão completa. Estes são fatores limitantes significativos para tornar o continente relativamente inóspito para o desenvolvimento das comunidades biológicas (COWAN; TOW, 2004; VAZ et al., 2011). No entanto, revelou-se que tal habitat possui uma grande diversidade de espécies extremófilas e microorganismos psicotrópicos, incluindo leveduras (DUARTE et

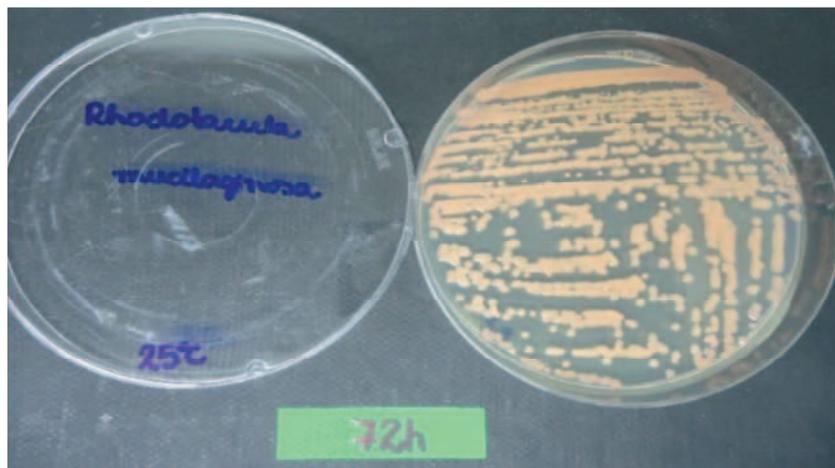
al., 2013). Carrasco et al. (2012) afirmam que esses microrganismos têm adaptado seus processos celulares vitais para sobreviver em ambientes frios, fazendo reciclagem de nutrientes e mineralização de matéria orgânica por meio de enzimas extracelulares (incluindo amilases, celulasas, inulinasas, proteases e lipases), as quais possuem uma eficiência catalítica mais elevada do que os seus homólogos mesófilos a temperaturas inferiores a 20 °C e exibem especificidades com substratos não-usuais. Portanto, em virtude da gama de substâncias que são forçados a produzir em condições extremas em busca da sobrevivência, tais microrganismos tornam-se candidatos atrativos para processos industriais que exigem uma elevada atividade enzimática.

Libkind et al. (2004) afirmam que as leveduras são membros comuns em ambientes aquáticos e as leveduras produtoras de carotenoides estão presentes em habitats marinhos e de água doce. A produção de proteases pela cepa estudada neste trabalho foi objeto de Chaud (2014), a qual realizou um *screening* de atividade proteolítica em agitador rotatório. No seu trabalho, foram utilizadas 99 leveduras, previamente isoladas em meio BDA (Batata Dextrose-Ágar) a 15 °C, na Divisão de Recursos Microbianos (DRM) do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas (CPQBA/UNICAMP). Estas cepas foram coletadas de diferentes locais, sendo que a *R. mucilaginosa* L07 foi proveniente de algas marinhas. Todos os microrganismos foram identificados por técnicas de Biologia Molecular.

Em seu trabalho, Chaud (2014) fez uma triagem a fim de verificar quais cepas eram produtoras de proteases. Dentre os 99 isolados, 14 leveduras mostraram-se protease positivas no teste qualitativo. Dentre estas, a maior atividade proteolítica (33,36 U.mL⁻¹) foi apresentada pela *R. mucilaginosa* L07, após cultivo em caldo Sabouraud, a 25 °C, utilizando o agitador rotatório. Realizou-se planejamentos experimentais visando o favorecimento desta atividade, alterando a composição do meio de cultivo, pH e temperatura. Quando comparado ao resultado obtido com caldo Sabouraud, conclui-se que o aumento da atividade proteolítica de 33,36 para 48,55 U.mL⁻¹ foi pouco significativo. Realizou-se, também, a caracterização das condições ótimas de temperatura e pH da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07, a qual revelou seu caráter ácido, cuja máxima atividade (71,14 U.mL⁻¹) foi obtida em pH 5,0 a 50 °C.

A Figura 3 ilustra colônias da levedura *R. mucilaginosa*, em ágar Sabouraud, a 25 °C, após 72 horas de incubação.

Figura 3. Colônias da levedura *R. mucilaginosa* L07 em ágar Sabouraud, após 72 horas de incubação a 25 °C



Fonte: Arquivo pessoal.

Portanto, sabendo que a *R. mucilaginosa* é uma levedura aeróbia e que tem atividade proteolítica comprovada anteriormente, pretendeu-se avaliar se o fornecimento de oxigênio, por meio de diferentes taxas de aeração e agitação, influencia ou não na quantidade de enzimas produzidas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de proteases pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07 em biorreator.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar a *R. mucilaginosa* L07 em biorreator sob diferentes condições de agitação e aeração;
- Determinar o K_La de cada condição testada para estabelecer as melhores variáveis estudadas;
- Determinar o perfil da atividade proteolítica da enzima produzida pela levedura em amostras colhidas em tempos pré-determinados;
- Quantificar o crescimento celular e dosar proteínas totais e glicose no meio de cultivo coletado em tempos pré-definidos;
- Avaliar a influência da agitação e da aeração sobre a atividade proteolítica;
- Calcular parâmetros cinéticos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local da pesquisa

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica, localizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4.2 Microrganismo

A cepa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa* selecionada para a realização deste trabalho é oriunda de uma coleta de amostras realizada na Antártida, em março de 2010, pela equipe da Profa. Dra. Lara Durões Sette (UNESP/Rio Claro) e encontra-se depositada na Coleção Brasileira de Microrganismos de Ambiente e da Indústria (CBMAI) da UNICAMP. O isolado L07 (*R. mucilaginosa*), selecionado para os ensaios de otimização da atividade proteolítica, encontra-se depositado sob o número de acesso CBMAI 1528.

4.2.1 Construção do banco de trabalho

Para a realização de análises posteriores, foi construído um banco de trabalho a partir da alíquota da levedura. O volume de 500 µL da suspensão contendo as células foi descongelado e adicionado a um frasco Erlenmeyer com capacidade para 125 mL, contendo 25 mL de caldo Sabouraud e encaminhado ao agitador rotatório (Tecnal) a 150 rpm e 25 °C, por 24 horas. Decorrido este tempo, o caldo foi aliqotado em tubos Eppendorf (1 mL), sendo que ao mesmo foi adicionada uma solução de glicerol 20% (v/v). Os tubos mantiveram-se preservados em *ultrafreezer*, a -80 °C.

4.3 Meio de cultivo

O meio Caldo Sabouraud (DIFCO LABORATORIES - BD) foi usado tanto para o pré-inóculo quanto para o meio de produção e preparado seguindo as especificações propostas pelo fabricante. Em seguida, foi autoclavado a 121 °C,

durante 20 minutos, tanto para o pré-inóculo como para o cultivo no biorreator. O Quadro 1 apresenta a composição do meio Sabouraud.

Quadro 1. Composição do Caldo Sabouraud (informação fornecida pelo fabricante - DIFCO)

Digestão péptica de tecido animal	5,0 g.L ⁻¹
Digestão pancreática de caseína	5,0 g.L ⁻¹
Glicose	20 g.L ⁻¹
pH inicial	5,6 ± 0,2

4.4 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado a partir do banco de trabalho. Após o completo descongelamento, cada alíquota de 1 mL do estoque foi transferido assepticamente para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de caldo Sabouraud. A incubação foi realizada em agitador rotatório a 150 rpm, 25 °C, durante 24 horas. Para cada reator, eram necessários 200 mL de inóculo para 1800 mL de meio de cultivo.

4.5 Condições de cultivo

4.5.1 Descrição do biorreator

Os cultivos foram realizados em biorreator (New Brunswick Scientific, modelo Bioflo 110), com capacidade para 3,0 litros (porém, o volume de trabalho foi de 2,0 litros). Este possui dorna de vidro de borossilicato e tampa de aço inox. Sua agitação é garantida por duas turbinas do tipo Rushton, com aeração submersa (Figura 4). Para medir o pH e o oxigênio dissolvido durante o cultivo, o biorreator possui um eletrodo de vidro esterilizável modelo 405-DPAS-SC-K8S/225 (Mettler Toledo) e um eletrodo polarográfico autoclavável (Mettler-Toledo, modelo InPro 6110/220), sendo que ambos foram devidamente calibrados. Uma sonda de temperatura, que envia sinal para o sistema de controle, foi acoplada internamente ao biorreator. Este, por sua vez, ativa a manta de aquecimento elétrica, instalada ao redor da dorna ou promove seu

resfriamento, pois o biorreator é conectado a um banho termorregulado (Lauda), cuja água flui pela serpentina de aço inox existente no interior do biorreator. A regulagem on-off dos dois sistemas mantém a temperatura em seu set-point, ou seja, na temperatura ajustada para o cultivo (25 °C). A retirada de amostras foi realizada por uma saída própria, uma mangueira de silicone com sua extremidade conectada a um amostrador. A Figura 5 ilustra o biorreator utilizado neste trabalho.

Figura 4. Representação do biorreator New Brunswick Scientific Bioflo. **A)** Vista superior; **B)** Vista lateral com manta de aquecimento; **C)** Vista lateral sem manta de aquecimento (NEW BRUNSWICK, 2002)

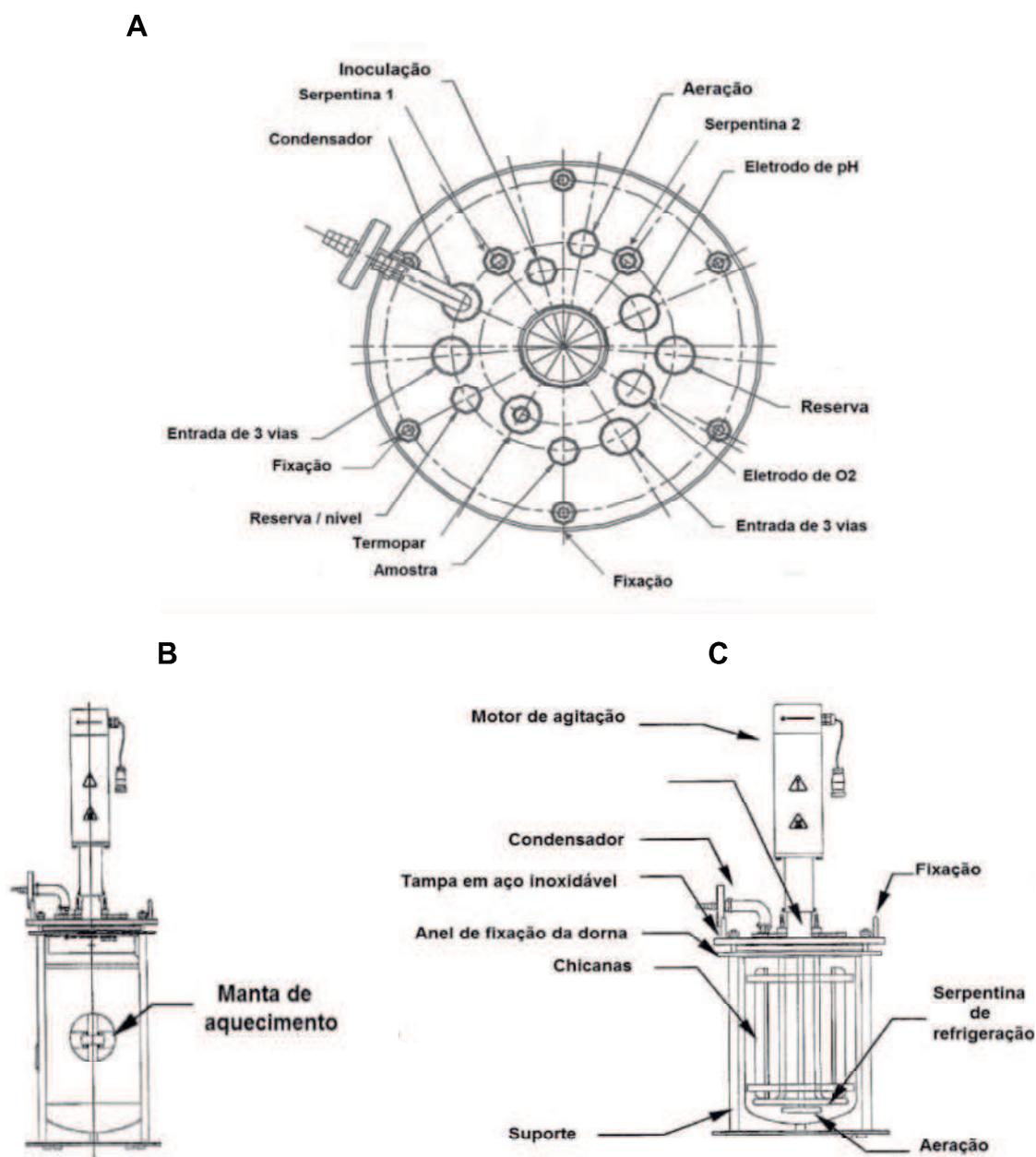


Figura 5. Foto do Biorreator New Brunswick Bioflo usado neste trabalho



Fonte: Arquivo pessoal.

4.5.2 Preparo do biorreator e do meio de cultivo

A dorna devidamente montada e contendo 1,8 L de caldo Sabouraud foi esterilizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. Após resfriamento da dorna, à temperatura ambiente, o biorreator foi encaminhado para o seu devido local, onde foram conectados todos os eletrodos necessários ao seu funcionamento.

Para controle da formação de espuma foi adicionado, sempre que necessário, um agente antiespumante (Antifoam Y-30 Emulsion; Sigma-Aldrich), previamente esterilizado.

4.5.5 Condições dos cultivos

Durante os cultivos, a agitação (em rotações por minuto – rpm) e a aeração (em volume de ar por volume de meio por minuto – vvm) variaram, de acordo com os valores descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Valores de agitação e aeração dos cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator

Cultivo	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)
1	100	1,0
2	300	1,0
3	500	1,0
4	500	1,5
5	500	2,0
6	500	2,5

As condições de cultivo encontram-se resumidas no Quadro 3.

Quadro 3. Condições pré-estabelecidas de cultivo da levedura *R. mucilaginosa* L07 em biorreator

Temperatura	25 °C
Duração	72 h
Volume do inóculo	0,2 L
Volume inicial do meio sem inóculo	1,8 L
Volume inicial total	2,0 L
pH inicial do meio de cultivo	5,6 ± 0,2
Agitação e aeração	Descritas no Quadro 2

4.5.6 Calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido

O monitoramento da concentração de oxigênio dissolvido foi realizado por meio do eletrodo descrito anteriormente (item 4.5.1). A sonda de oxigênio foi calibrada antes do início de cada cultivo, em 0 e 100%. A calibração da sonda de oxigênio em zero foi realizada com o ajuste da agitação a 500 rpm e temperatura de $25 \pm 0,5$ °C, seguida por borbulhamento do gás nitrogênio no meio de cultura, até o oxigênio atingir valores estáveis próximos de zero. Já a calibração da sonda em 100% foi realizada no meio de cultura, sob a agitação a 500 rpm e borbulhando ar comprimido (1,0 vvm), até que o valor de oxigênio

dissolvido atingisse valor constante. O ajuste em 100% foi feito manualmente (SANTOS, 2007). Para a calibração do eletrodo foi utilizado o “Guia de Operações” Bioflo 110 Fermentor manual nº M1273-0054 (NEW BRUNSWICK, 2002).

4.5.7 Calibração do eletrodo de pH

Utilizou-se soluções tampão de pH=7,0 e de pH=4,0 (Synth) para calibrar o eletrodo de pH descrito anteriormente no item 4.5.1. A calibração foi realizada antes da esterilização da dorna, para que a dorna e o eletrodo fossem esterilizados juntos.

4.5.8 Determinação do coeficiente volumérico de transferência de oxigênio (K_{La})

Para determinar o produto entre o coeficiente global de transporte de massa relativo à fase líquida (K_L) e a área de interface (gás/líquido) por unidade de volume de líquido (a), utilizou-se a técnica do *gassing-out* (PIRT, 1975). O método consiste na eliminação do oxigênio dissolvido no meio de cultura através da introdução de nitrogênio. Após certo tempo, ligou-se a aeração no biorreator e anotou-se os valores crescentes da concentração de oxigênio dissolvido no decorrer do tempo. O valor do K_{La} foi dado pela equação:

$$\ln(1-c/c^*) = - K_{La} \cdot \theta \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

C: concentração de oxigênio dissolvido;

C*: concentração de saturação de oxigênio dissolvido;

K_{La} : coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio;

θ : tempo.

sendo que $c=0$ quando $\theta = 0$. Uma regressão semi-logarítmica de $(1-c/c^*)$ com o tempo (θ) fornece o valor de K_{La} .

As determinações do K_{La} foram realizadas antes do ensaio, no meio de cultura, sob as mesmas condições de cultivo no biorreator.

Após as calibrações dos eletrodos, foi colocado 0,2 mL do inóculo na dorna contendo o caldo Sabouraud, assepticamente, através de uma abertura da tampa de inox, utilizando um funil esterilizado. Vale ressaltar que esta foi a última etapa realizada antes do cultivo propriamente dito; ou seja, todas as sondas já estavam conectadas ao biorreator.

4.6 Metodologias analíticas

Ao longo do cultivo, foram coletadas amostras, em tempos pré-definidos, para quantificar crescimento celular (biomassa), substrato (glicose e proteínas totais) e produção de proteases (atividade proteolítica). Os volumes coletados (de 5 mL, cada) foram transferidos para tubos Falcon com capacidade para 50 mL, os quais foram previamente identificados e pesados em balança analítica (Schimatzu). Após cada coletada, as amostras foram centrifugadas (centrífuga: Jouan) a 5000 g, por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi guardado para quantificação da atividade proteolítica, glicose e proteínas totais. O precipitado foi utilizado para quantificar a biomassa.

Os volumes das amostras retiradas totalizaram menos de 10% do volume total de cultivo do biorreator, de modo a evitar alterações significativas nas condições do cultivo.

4.6.1 Quantificação da biomassa

A biomassa foi obtida por meio do peso seco das células. Os tubos contendo a massa sólida (células) foram encaminhados a uma estufa de aquecimento (Tecnal) a 50 °C, onde permaneceram até que a massa ficasse constante (em média, 24 horas). Os tubos foram pesados novamente e a biomassa foi calculada a partir da diferença entre as massas (biomassa = tubos Falcon contendo células – tubos Falcon vazios).

4.6.2 Quantificação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi quantificada com o substrato azocaseína seguindo a metodologia adaptada de Charney e Tomarelli (1947). Os tubos testes foram preparados com a adição de 0,15 mL de extrato enzimático previamente centrifugado e livre de células, 0,15 mL de reagente azocaseína 0,5% p/v em tampão acetato de sódio 50 mM e pH 5,0. Estes tubos foram incubados a 37 °C, por 40 minutos, em banho termorregulado (Nova Ética).

A reação foi interrompida pela adição de 0,15 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10% e o excesso de proteína precipitou. Em seguida, os tubos-teste foram centrifugados a 17000 xg, por 10 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, 0,1 mL do sobrenadante da amostra foi transferido para uma microplaca e adicionado 0,1 mL de hidróxido de potássio (KOH) 0,5 M. A reação com KOH induz a formação da cor laranja no teste, característica dos grupamentos azo em pH alcalino e a intensidade desta coloração foi medida, posteriormente, em espectrofotômetro UV-Visível a 430 nm (Molecular Devices).

Os brancos das amostras foram preparados da mesma maneira, só que foram previamente aquecidos a 100 °C, durante 20 minutos, para inativar as proteases presentes nestas amostras.

Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir aumento na absorbância de 0,001 por minuto de reação a 430 nm, sendo expressa em U.mL⁻¹. O fator de diluição desta reação equivale a 30. O resultado da atividade (UI) é multiplicado por 750, que é o resultado do seguinte quociente: $30/(0,001*40)$, onde 30 é o fator de diluição, 0,001 refere-se à absorbância e 40 refere-se ao tempo em que os tubos permanecem no banho termorregulado.

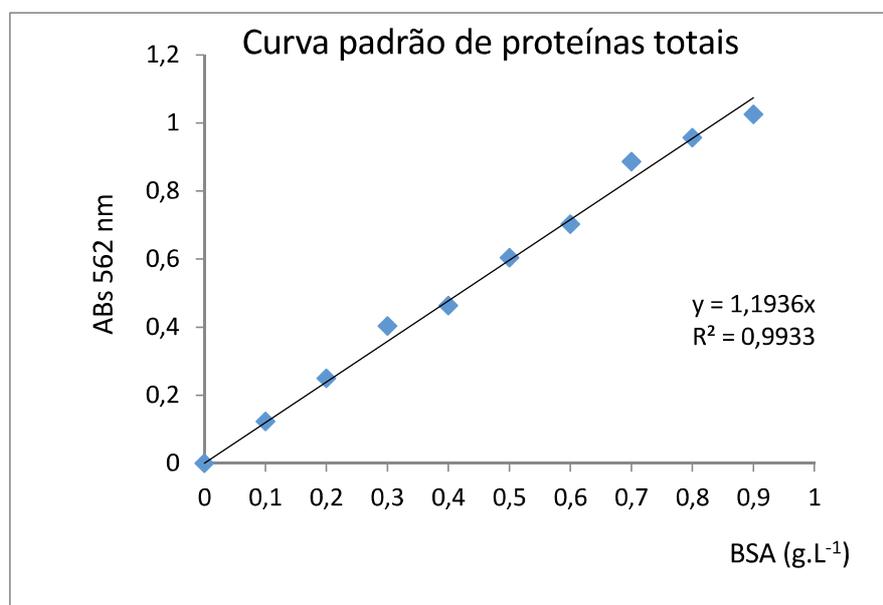
4.6.3 Dosagem de proteínas totais

Para determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizada a metodologia do ácido bicinconínico (BCA), adaptada a partir de Smith et al. (1985). As amostras do sobrenadante previamente coletadas e centrifugadas foram diluídas em tampão fosfato salino (PBS) na proporção de 1:20

(amostra:tampão). As amostras diluídas foram incubadas com solução BCA (sulfato de cobre + ácido biciconínico, na proporção 1:50), em microplaca, sendo 25 μL de amostra diluída para 200 μL de reagente, durante 30 minutos e a 37 $^{\circ}\text{C}$. A seguir, as densidades ópticas das amostras foram determinadas em espectrofotômetro (Molecular Devices) com o comprimento de onda de 562 nm.

Para a determinação da curva padrão (Figura 6), foi utilizada albumina de soro bovino (BSA) com concentrações variando de 0,1 a 1,0 g.L^{-1} . Foram calculadas a regressão linear e a equação da reta. Os valores da concentração de proteína total foram expressos em g.L^{-1} de cultivo, levando-se em consideração as respectivas diluições.

Figura 6. Curva padrão de proteínas totais



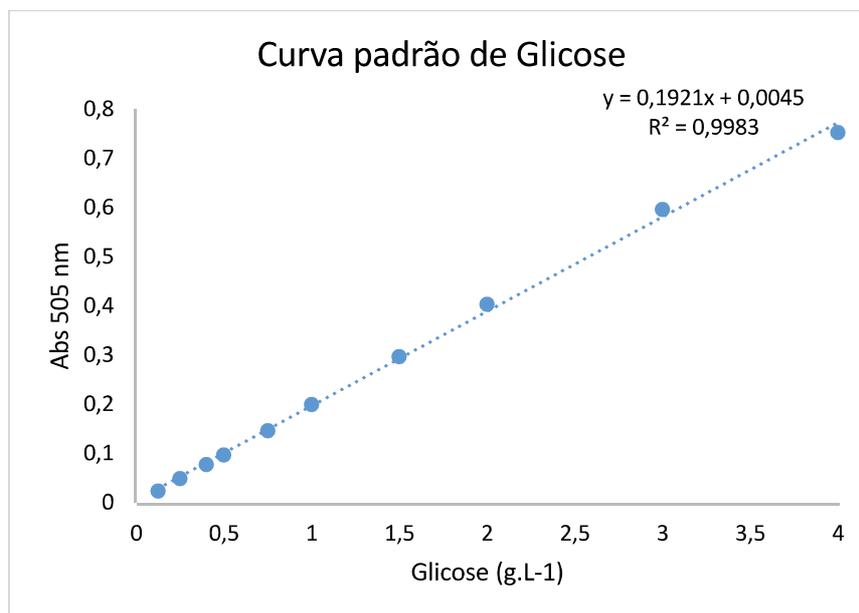
4.6.4 Dosagem de glicose

A glicose presente no sobrenadante das amostras foi quantificada através de um teste enzimático colorimétrico (kit Bioliquid – Laborclin). As amostras foram previamente diluídas com água deionizada na proporção de 1:20 (amostra:água). Para quantificação da glicose, seguiu-se as instruções propostas pelo kit. Diluiu-se 10 μL da amostra diluída em 1 mL de reagente. Essa

mistura foi incubada a a 37 °C durante 10 minutos. A seguir, determinou-se a densidade óptica das amostras com o comprimento de onda de 505 nm.

Para a determinação da curva padrão (Figura 7), foi utilizada uma solução de glicose com concentrações variando de 0,125 a 1,0 g.L⁻¹. Assim, foram calculadas a regressão linear e a equação da reta. Os valores da concentração de glicose foram expressos em g.L⁻¹ de cultivo, levando-se em consideração as respectivas diluições.

Figura 7. Curva padrão de glicose



4.7 Determinação dos parâmetros cinéticos

A partir dos dados obtidos, foram determinados alguns parâmetros cinéticos, de acordo com as seguintes equações:

- Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$):

$$\ln(X^*) = \ln X_0 + \mu_{\text{máx}} + t \quad (\text{equação 2})$$

Onde: X^* : concentração celular ao longo da fase exponencial; X_0 : concentração celular inicial; t : tempo.

- Fator global de conversão $Y_{x/s}$ (rendimento de biomassa em relação ao substrato):

$$Y_{x/s} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{S_0 - S_f} \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o 3})$$

Onde: $X_{m\acute{a}x}$: concentra\c{c}\~{a}o celular m\acute{a}xima; X_0 : concentra\c{c}\~{a}o celular inicial; S_0 e S_f : concentra\c{c}\~{a}o inicial e final de substrato (glicose), respectivamente.

- Produtividade em produto (proteases) ($Prod_p$): calculada ponto a ponto:

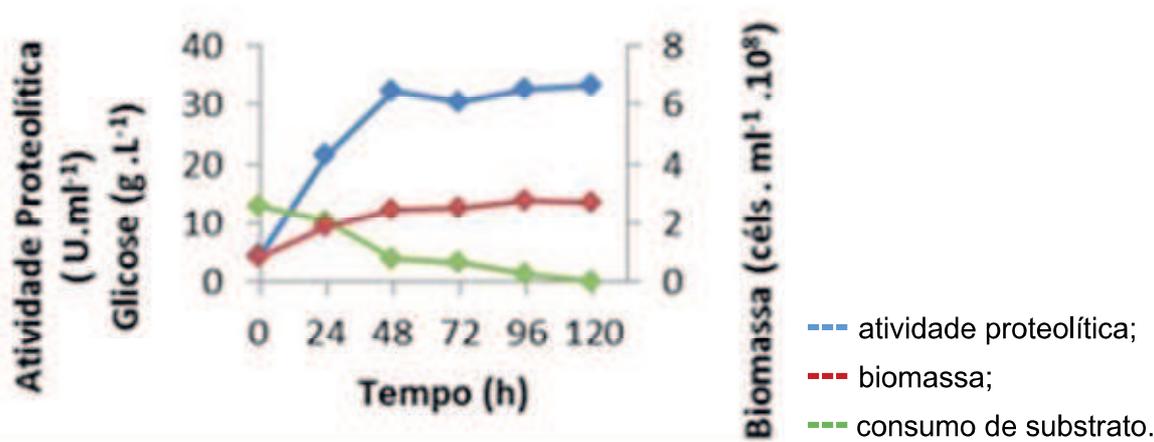
$$Prod_p = \frac{P_f - P_0}{t_{fp} - t_0} \quad (\text{equa\c{c}\~{a}o 4})$$

Onde: P_f e P_0 : atividade proteol\c{t}ica final e inicial, respectivamente; t_{fp} : tempo de cultivo correspondente a P_f ; t_0 : tempo inicial igual a zero.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes quantitativos de atividade proteolítica realizados por Chaud (2014) em agitador rotatório indicaram que os máximos valores de produção de proteases foram obtidos em 48 horas de cultivo ($33,36 \text{ U.mL}^{-1}$) e mantiveram-se constantes após este período (Figura 8).

Figura 8. Atividade proteolítica da *R. mucilaginosa* L07 em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C / 150 rpm / 120 h



Fonte: Chaud, 2014.

Portanto, sabendo que Chaud (2014) concluiu que, nestas condições, após as 48 horas de cultivo a produção de enzimas proteolíticas se estabiliza, os cultivos do presente trabalho foram realizados durante 72 horas, em biorreator, com o intuito de verificar se a atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07 poderia aumentar com o tempo.

5.6 Resultados experimentais obtidos em biorreator

Foram realizados 6 cultivos com *R. mucilaginosa* L07 em biorreator, cada um com duração de 72 horas. Tais experimentos foram realizados conforme as condições descritas anteriormente (Quadro 3).

5.6.1 Cálculo do K_{La}

Para cada condição experimental, foi realizada a determinação do K_{La} , no próprio meio de cultivo. Os valores obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados experimentais do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La})

Cultivo	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Coeficiente angular da reta $\ln(C_s-C)$ versus tempo	K_{La} (h^{-1})
1	100	1,0	0,0049	18
2	300	1,0	0,0136	49
3	500	1,0	0,0275	99
4	500	1,5	0,0337	121
5	500	2,0	0,0374	135
6	500	2,5	0,0283*	102*

* valores incoerentes

Como se pode observar, o valor do K_{La} cresce de forma diretamente proporcional aos valores de agitação e aeração. Porém, há uma exceção: quando a agitação equivale a 500 rpm e a aeração é igual a 2,5 vvm, observa-se que o valor encontrado para o K_{La} é de $102 h^{-1}$. Logicamente, este valor está incoerente e por esse motivo a determinação deste ponto deverá ser refeita, pois, de acordo com Müller et al., 2012, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) é uma característica crucial para comparar, otimizar e escalonar a eficiência de transferência de massa em biorreatores. Ou seja, para garantir a reprodutibilidade dos experimentos, os valores aqui apresentados devem ser determinados corretamente.

5.6.2 Quantificações analíticas

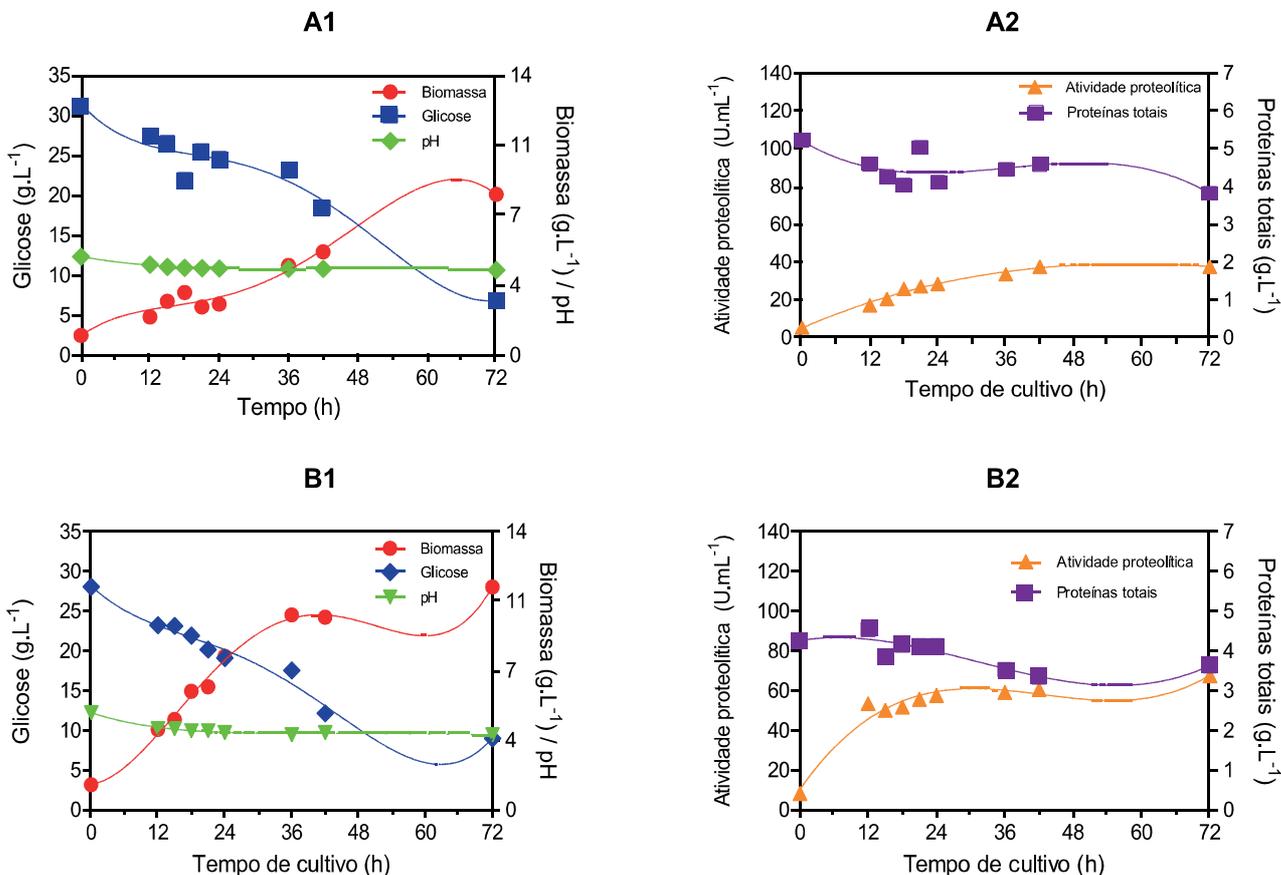
Os valores finais ($t=72 h$) dos parâmetros crescimento celular (biomassa), substrato (glicose e proteínas totais), pH e produção de proteases (atividade proteolítica) dos ensaios realizados são mostrados na Tabela 2 e os perfis de todos os cultivos estão ilustrados na Figura 9.

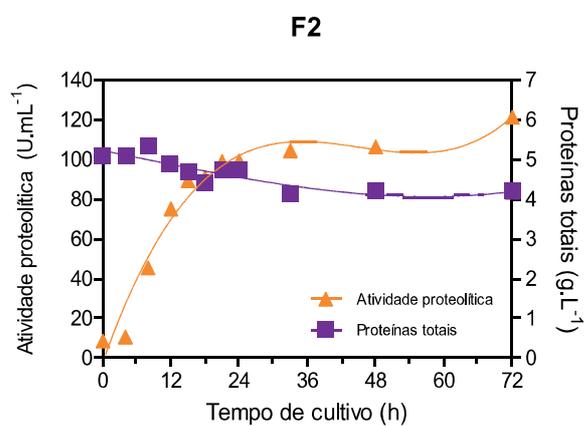
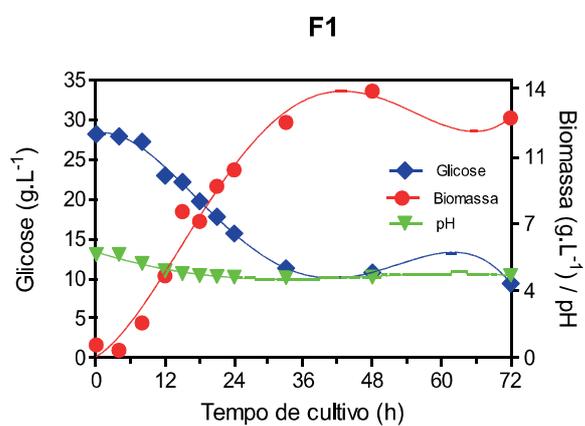
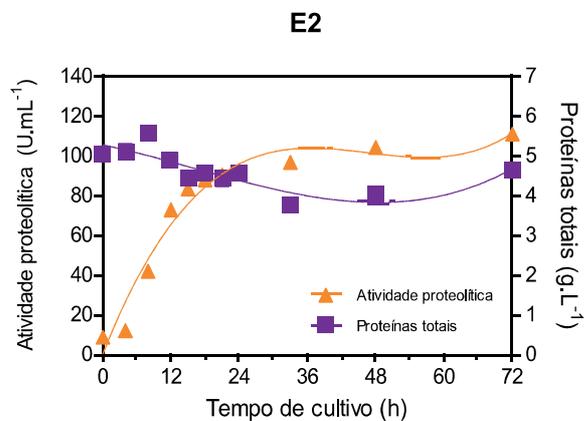
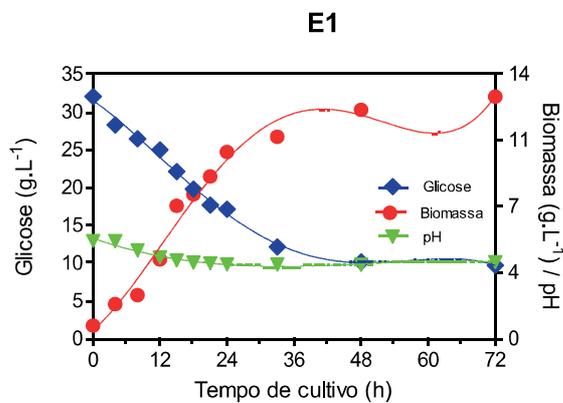
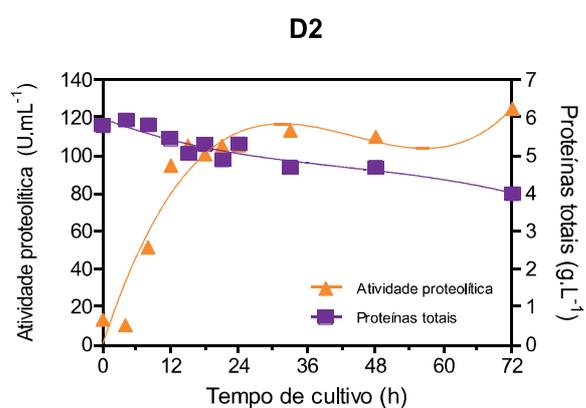
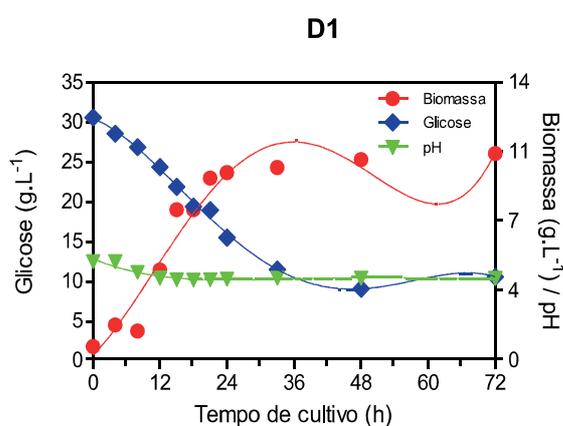
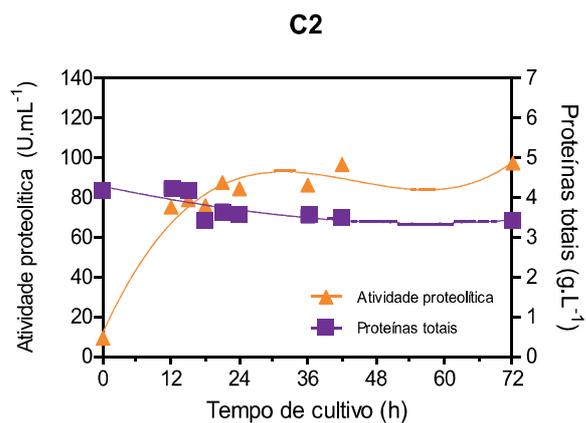
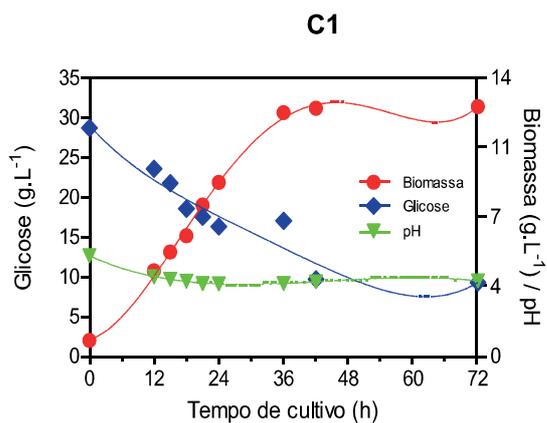
Tabela 2. Valores finais (t=72 h) dos parâmetros biomassa, glicose, proteínas totais, pH e atividade proteolítica dos 6 cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator

Parâmetros (72h)	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4	Cultivo 5	Cultivo 6
Agitação (rpm)	100	300	500	500	500	500
Aeração (vvm)	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0	2,5
K _{La} (h ⁻¹)	18	49	99	121	135	102*
Biomassa (g.L ⁻¹)	8,04	11,22	12,56	10,40	12,80	12,52
pH	4,27	3,8	3,8	4,12	4,06	4,31
Atividade proteolítica (U.mL ⁻¹)	37,68	67,55	97,24	124,88	110,75	121,45
Glicose (g.L ⁻¹)	6,90	9,04	9,30	10,52	9,70	9,45
Proteínas totais (g.L ⁻¹)	3,83	3,63	3,42	3,99	4,63	4,18

*valor que será recalculado

Figura 9. Representação das curvas biomassa, glicose, proteínas totais, pH e produção de proteases de cultivos de *R. mucilaginosa* L07 em biorreator. A1 e A2) Agitação: 100 rpm e aeração: 1,0 vvm; B1 e B2) Agitação: 300 rpm e aeração: 1,0 vvm; C1 e C2) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,0 vvm; D1 e D2) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,5 vvm; E1 e E2) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,0 vvm; F1 e F2) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,5 vvm





Meios complexos ou com altos níveis de proteína promovem o desenvolvimento de espuma; se não houver controle, a mesma pode causar perda do caldo de cultivo e, conseqüentemente, do produto de interesse, os quais se perdem juntamente com a espuma. Além do mais, pode haver problemas de assepsia devido a eventuais entupimentos nas entradas e saídas do biorreator e da presença de bactérias mortas na espuma. Os agentes antiespumantes (surfactantes) são efetivos em reduzir a formação de espuma, porém diminuem a taxa de transferência de oxigênio, inibem o crescimento celular e causam problemas na posterior purificação do produto, devido à sua toxicidade (ARAUZ, 2011). Por estes motivos, foi adicionada uma quantidade mínima de antiespumante, apenas suficiente para o controle da formação de espuma em todos os cultivos.

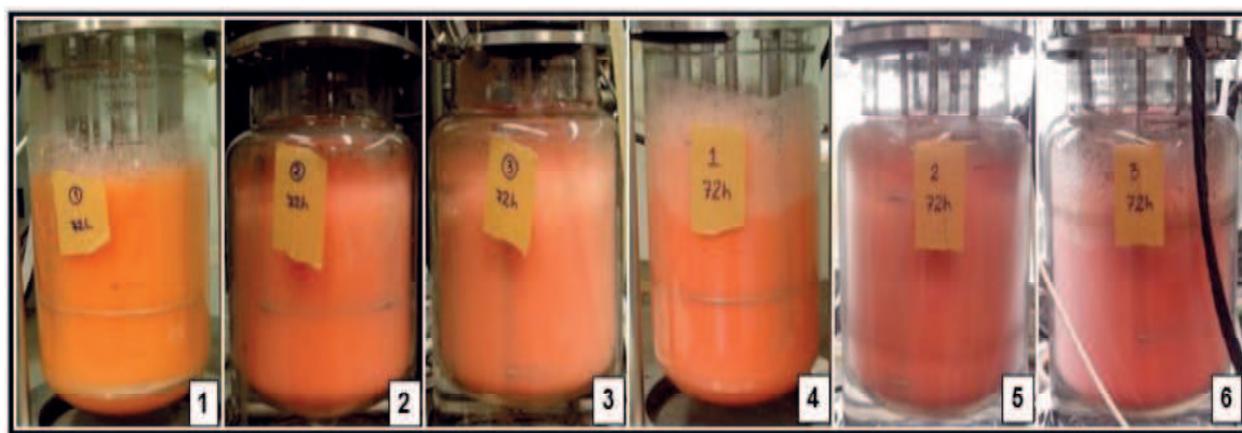
Como observado na Tabela 2, a biomassa foi maior no Cultivo 5 (12,80 g.L⁻¹), no qual a agitação e a aeração foram de 500 rpm e 2,0 vvm. Porém, dois valores quase equivalentes foram encontrados nos Cultivos 3 e 6 (12,56 e 12,52 g.L⁻¹), nos quais a agitação foi de 500 rpm e as aerações foram de 2,5 vvm e 1,0 vvm, respectivamente. Portanto, sugere-se que a aeração não influenciou no valor final da biomassa de tais cultivos, nos quais o valor da agitação foi o máximo testado no presente trabalho (500 rpm). O contrário foi observado no Cultivo 1, que apresentou a menor biomassa (8,4 g.L⁻¹) e foi realizado com 100 rpm de agitação e 1,0 vvm de aeração. Sabe-se que, com o crescimento celular do microrganismo cultivado, a quantidade de oxigênio necessária para manter a viabilidade das células aumenta com o tempo, tornando obrigatório o fornecimento contínuo de oxigênio. Além disso, com o aumento do número de células, a viscosidade do meio varia, fazendo com que a transferência de oxigênio seja prejudicada. Assim, como mostra a Figura 2, o oxigênio possui mais barreiras até chegar ao microrganismo. Portanto, uma agitação considerável permite que os nutrientes e o oxigênio se distribuam melhor no meio, favorecendo o crescimento celular. Através desses dados, comprova-se que a *R. mucilaginosa* é uma levedura aeróbia.

Aksu e Eren (2005) observaram um aumento na biomassa e na formação do produto de interesse (neste caso, carotenoides) quando as taxas de aeração para *R. mucilaginosa* eram elevadas. Neste caso, a aeração mostrou-se

benéfica para o crescimento celular. No presente trabalho, observando-se os gráficos da Figura 7, nota-se que os perfis de crescimento celular e atividade proteolítica se assemelham por serem crescentes ao longo do tempo nos cultivos de 2 a 6. Esse fato só não é observado no cultivo 1, provavelmente porque o fornecimento de oxigênio para o meio foi insuficiente para o crescimento celular.

Sabe-se que a *R. mucilaginosa* é uma espécie comumente associada à produção de carotenoides, os quais são responsáveis pela atividade pró vitamina A e propriedades antioxidantes, o que tem estimulado seu uso em pesquisas na área biotecnológica. Segundo Squina e Mercadante (2003), nos microrganismos, os carotenoides estão localizados na parede celular. Assim, a cor rosa que caracteriza esta levedura é derivada de tais pigmentos e torna-se um indicativo visual do crescimento celular. Na Figura 10, podemos observar os 6 meios oriundos dos cultivos realizados no biorreator, após 72 horas.

Figura 10. Ilustração dos meios de cultura oriundos dos 6 cultivos da levedura *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator durante 72 horas. 1) Agitação: 100 rpm e aeração: 1,0 vvm; 2) Agitação: 300 rpm e aeração: 1,0 vvm; 3) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,0 vvm; 4) Agitação: 500 rpm e aeração: 1,5 vvm; 5) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,0 vvm; 6) Agitação: 500 rpm e aeração: 2,5 vvm



Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 10.1, ilustra-se o meio cultivado a 100 rpm com 1,0 vvm de aeração, no qual a tonalidade do meio é notavelmente menos intensa que nas outras figuras e tem aspecto alaranjado, ao contrário dos demais, que são rosas. Ademais, na Figura 10.1, o meio aparenta ser mais translúcido, pois as chicanas parecem mais notáveis que nas outras figuras.

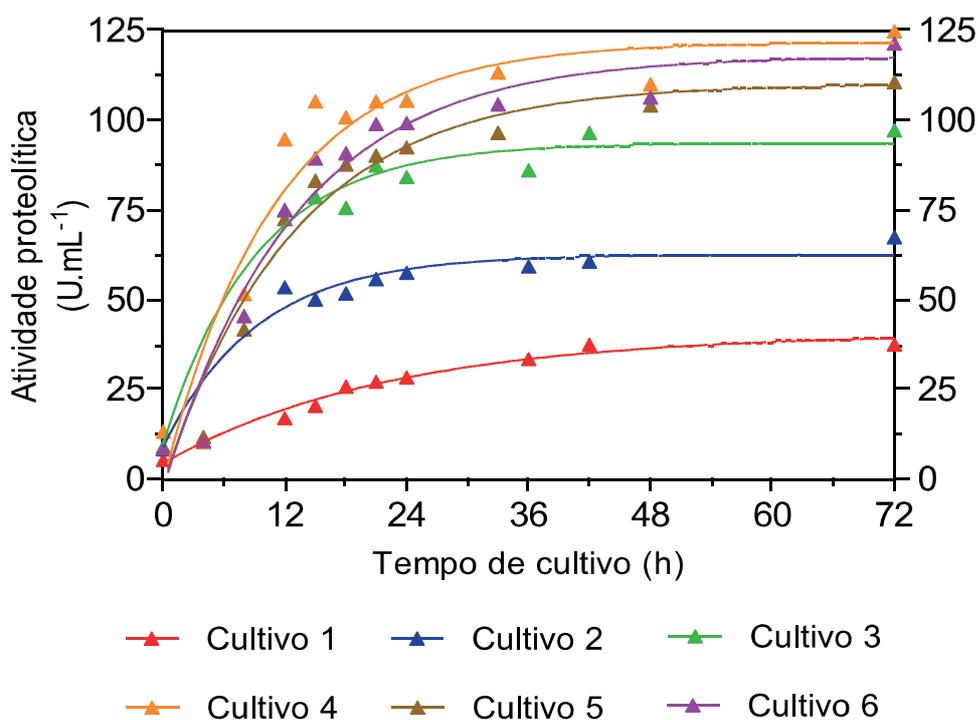
Em todos os cultivos, houve uma discreta acidificação do meio, observada pela diminuição do pH, provavelmente pela produção de ácidos orgânicos. Sabe-se que na ausência de meio tamponado, o valor do pH cai durante as primeiras fases de fermentação e este fenômeno pode ser tido como um reflexo da atividade da levedura, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H^+ durante a geração de ATP pela respiração (DE MORAIS, 1984). Sugere-se a realização de novos cultivos, controlando o pH, para verificar a influência desta variável na atividade proteolítica, pois o controle do pH é importante, dentre outros motivos, para constatar se em condições básicas há uma repressão catabólica.

Em um primeiro momento, realizou-se os Cultivos 1, 2 e 3, para os quais a aeração foi mantida em 1,0 vvm e variou-se a agitação em 100, 300 e 500 rpm. Como é possível observar na Tabela 2, a atividade proteolítica é crescente quando se compara os três cultivos (37,68, 67,55 e 97,24 U.mL⁻¹, respectivamente). Assim, para os cultivos subsequentes, decidiu-se fixar a agitação em 500 rpm e variar o a aeração. Os Cultivos 4, 5 e 6 foram realizados com 1,5, 2,0 e 2,5 vvm, respectivamente. Ainda observando os dados fornecidos na Tabela 2, nota-se que as atividades proteolíticas dos mesmos foram maiores do que nos Cultivos realizados anteriormente. Porém, a partir do Cultivo 4 a atividade proteolítica parece estar em um mesmo patamar, pois seus valores são muito próximos (124,88, 110,75 e 121,45 U.mL⁻¹, respectivamente). Isso sugere que o fornecimento de oxigênio, que é um resultado da agitação e aeração, passa a ser indiferente no valor da atividade proteolítica; ou seja, o meio parece estar saturado de oxigênio. Por mais que o volume de ar seja fornecido em valores maiores, há pouca diferença no valor da atividade. Para melhor comparar as atividades proteolíticas dos seis cultivos, as mesmas foram colocadas em função do tempo e apresentadas na Figura 11.

É importante fornecer uma combinação ideal de aeração e agitação para as células pois, de acordo com Potumarthi et al. (2008), as mesmas poderão se romper no biorreator quando tais taxas são maiores, o que pode resultar em uma transferência deficiente de massa (oxigênio/substrato). Tais autores chegaram a esta conclusão quando avaliaram a influência de aeração e agitação na produção de lipases por *R. mucilaginosa* em biorreator de tanque agitado. Utilizando as mesmas condições de pH e temperatura, foram testadas diferentes

aerações (1,0, 2,0 e 3,0 vvm) e agitações (100, 200 e 300 rpm), sendo que a atividade máxima de lipase foi obtida com valores intermediários de 2,0 vvm e 200 rpm pois, em valores superiores, a atividade enzimática era inibida.

Figura 11. Atividades proteolíticas dos 6 cultivos de *R. mucilaginoso* L07 em biorreator



Os resultados encontrados neste trabalho corroboram com os de Pastor et al. (2001), que avaliaram a influência de alguns fatores na produção de proteases por *Bacillus subtilis*, dentre eles o fornecimento de oxigênio. Neste caso, a aeração foi mantida em 1,0 vvm e a agitação foi testada em três valores diferentes: 350, 750 e 1000 rpm. Os autores concluíram que a agitação teve um efeito favorável até valores de 750 rpm. O valor mais elevado da produção de proteases, obtido na agitação citada, pode ser atribuído a uma maior disponibilidade de oxigênio no meio de cultura; no entanto, taxas mais elevadas de agitação podem aumentar a pressão de oxigênio do sistema, sem provocar aumento de produção, pois essas altas taxas podem alterar a estrutura da enzima.

De acordo com Singh e Garg (2014), que estudaram a produção de proteases a partir de *Bacillus cereus*, a otimização da taxa de fornecimento de

oxigênio para as células é essencial para a produção de proteases sob crescimento aeróbio. Portanto, um equilíbrio adequado de agitação e aeração é imprescindível para evitar a baixa disponibilidade de oxigênio ou qualquer dano mecânico às células, que podem reduzir o crescimento celular, bem como rendimento da enzima.

Ao comparar os resultados obtidos em agitador rotatório e biorreator, observa-se que a atividade enzimática aumentou em torno de 275%, de 33,36 (CHAUD, 2014) em agitador para 124,88 U.mL⁻¹ nas melhores condições (1,0 vvm, 500 rpm, 25 °C, 72 horas) em biorreator. Assim, este fato sugere que o fornecimento de oxigênio ao processo produtivo foi essencial para o aumento da atividade proteolítica da levedura *R. mucilaginosa* L07, pois a atividade proteolítica praticamente quadruplicou quando a levedura foi cultivada em biorreator.

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes o microrganismo (ou a biomassa), os produtos do metabolismo (ou metabólitos, dentre eles o produto que se deseja obter) e os nutrientes ou substratos que compõem o meio de cultura. Assim, os valores obtidos nos cultivos permitem definir os perfis das curvas de cada parâmetro ou a forma matemática destas, para uma análise adequada dos fenômenos sob o ponto de vista cinético. A partir do conhecimento da cinética, pode-se estabelecer relações entre os valores, possibilitando a transposição de um experimento de laboratório para a escala industrial (SCHMIDELL, 2001).

O mesmo autor define que, em biotecnologia, o termo produtividade está relacionado com velocidade, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um processo fermentativo. A produtividade em produto, definida pela equação 4 (item 4.7), representa a velocidade média de formação do produto referente ao tempo de cultivo correspondente à concentração máxima do produto. A concentração inicial do produto é geralmente desprezível frente ao valor final ou máximo.

Com relação aos 6 cultivos realizados com a *R. mucilaginosa* em biorreator, calculou-se as produtividades em produto tempo a tempo, as quais são apresentadas na Tabela 3. Como se pode observar, nos Cultivos de 2 a 6,

as maiores produtividades são encontradas em torno das 12 horas. O maior valor foi atingido no Cultivo 4, com $6,784 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, seguido dos Cultivos 3, 5 e 6, os quais apresentaram praticamente o mesmo valor. Após as 12 horas, todas as produtividades decaem, provavelmente devido à degradação ou ao consumo da enzima produzida. Quanto ao Cultivo 1, observa-se que a maior produtividade foi encontrada às 18 horas, com $1,139 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Comparando-se este cultivo aos demais, nota-se que, além de o valor ser bem abaixo, o mesmo só é atingido 6 horas depois. Este resultado demonstra, mais uma vez, a importância do fornecimento de oxigênio para microrganismos cultivados em biorreator, visto que a produtividade do Cultivo 4, realizado a 500 rpm e 1,5 vvm, é quase 6 vezes maior que o valor máximo encontrado para o Cultivo 1.

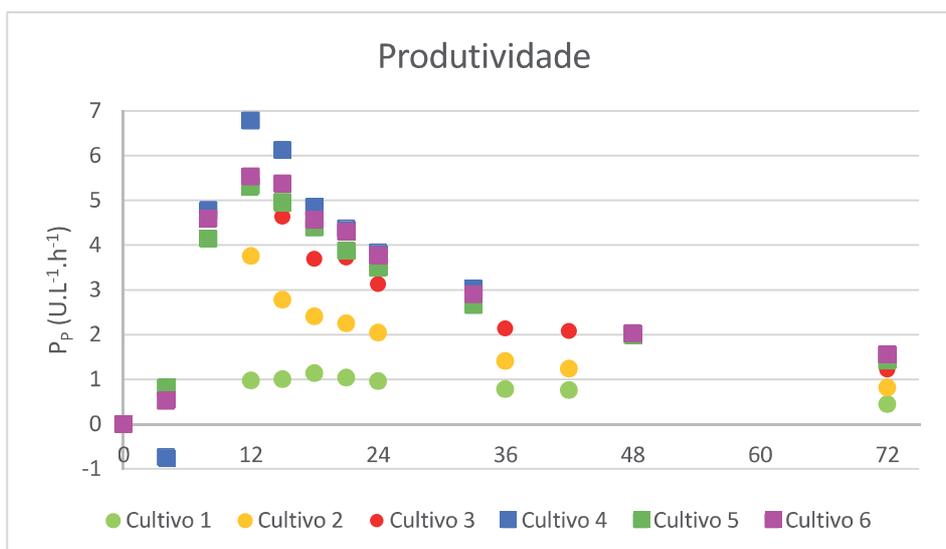
Na Figura 12, todos os valores encontrados na Tabela 3 estão dispostos em curvas para uma visualização mais clara. Podemos notar que a curva relacionada ao Cultivo 1 está sempre igual ou abaixo de $1,0 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Um maior destaque pode ser dado ao ponto de maior produtividade do Cultivo 4, que se encontra próximo ao valor de $7,0 \text{ U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Tabela 3. Valores das produtividades em produto dos 6 cultivos da *R. mucilaginoso* L07 realizados em biorreator, com duração de 72 horas

Tempo (h)	Produtividades ($\text{U.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)					
	Cultivo 1	Cultivo 2	Cultivo 3	Cultivo 4	Cultivo 5	Cultivo 6
0	0	0	0	0	0	0
4	---	---	---	-0,734	0,813	0,519
8	---	---	---	4,784	4,144	4,598
12	0,977	3,764	5,488	6,784	5,327	5,535
15	1,009	2,781	4,639	6,132	4,967	5,378
18	1,139	2,411	3,699	4,861	4,394	4,563
21	1,039	2,255	3,728	4,377	3,884	4,299
24	0,960	2,049	3,131	3,841	3,494	3,776
33	---	---	--	3,030	2,663	2,902
36	0,782	1,414	2,138	---	---	---
42	0,765	1,244	2,081	---	---	---
48	---	---	---	2,016	1,989	2,035
72	0,447	0,820	1,223	1,549	1,417	1,565

*---: amostra não coletada nesse tempo

Figura 12. Ilustração dos valores das produtividades em produto dos 6 cultivos da *R. mucilaginosa* L07 dispostas em curvas



Em concordância com os resultados aqui encontrados, Potumarthi et al. (2008) afirmam que a transferência de oxigênio é um parâmetro muito importante para obter uma produtividade máxima em fermentações microbianas, o qual pode ser alcançado por meio de aeração e agitação.

Os dados obtidos a partir do cálculo da produtividade relacionam a produção de proteases com o tempo de cultivo. Para o Cultivo 4, a maior atividade proteolítica ($124,88 \text{ U.mL}^{-1}$) foi obtida em torno das 72 horas, porém a maior produtividade foi encontrada às 12 horas de cultivo, cuja atividade foi de $94,789 \text{ U.mL}^{-1}$ (dado não mostrado). Do ponto de vista industrial, no qual almeja-se uma maior produção em menor tempo, torna-se mais vantajoso realizar 6 cultivos com duração de 12 horas do que apenas 1 de 72 horas, pois a quantidade de proteases obtida será aproximadamente 4,5 vezes maior, durando a mesma quantidade de horas. Portanto, é importante encontrar uma condição experimental que promova não somente uma alta produção, mas que seja industrialmente mais vantajosa.

Como foi observado na Figura 9, a biomassa aumentou ao decorrer do cultivo e, conseqüentemente, a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato no produto também cresceu. Portanto, como afirma Schimidell (2001), é mais lógico analisar os valores das velocidades instantâneas com relação à referida biomassa, ou seja,

especificando-se o valor da mesma em um dado instante, conforme indicam a expressão para cálculo da velocidade específica de crescimento ou μ_X (equação 1; item 4,7).

Considerando um determinado tempo de fermentação, os correspondentes valores de biomassa, substrato e produto podem ser relacionados entre si. Por se tratar de conversão, as variáveis devem estar na mesma unidade de medida (neste caso, $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). O fator $Y_{x/s}$ trata-se da conversão de substrato em células, ao passo que $Y_{p/s}$ relaciona-se à conversão do substrato em produto. Contudo, o $Y_{p/s}$ não foi calculado porque a concentração da enzima não foi quantificada, apenas a sua atividade.

Os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (ou seja, a máxima velocidade específica de crescimento) e $Y_{x/s}$ de cada cultivo são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{x/s}$ dos 6 cultivos da *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator

	Cultivo					
	1	2	3	4	5	6
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1}) /$ Tempo*	0,043/36 h	0,034/15 h	0,062/15 h	0,004/33 h	0,043/24 h	0,026/33 h
$Y_{x/s} (\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	0,290	0,522	0,605	0,484	0,542	0,630

*Tempo em que o valor de $\mu_{\text{máx}}$ foi encontrado

O maior valor para o $\mu_{\text{máx}}$ foi encontrado no Cultivo 3, com $0,062 \text{ h}^{-1}$, após 15 horas de cultivo. Já o menor valor foi encontrado no Cultivo 4, com $0,004 \text{ h}^{-1}$, às 33 horas. Segundo Neves (2003), a velocidade de crescimento celular passa a ser um fator determinante para a eficiência do processo quando há problemas de transferência de oxigênio para o meio. O ideal é que a mesma se mantenha em níveis desejáveis para obter altas concentrações celulares e, conseqüentemente, aumento na quantidade de produto formado. Porém, a velocidade de crescimento celular parece indiferente para comparar os cultivos realizados neste trabalho, tendo em vista que os Cultivo 1 e 5 apresentaram o mesmo $\mu_{\text{máx}}$, mas a biomassa final dos mesmos foi consideravelmente discordante ($8,04$ e $12,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente). Os Cultivos 3, 5 e 6 alcançaram praticamente a mesma biomassa ao final das 72 horas de cultivo ($12,56$, $12,83$ e $12,52 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sendo que o $\mu_{\text{máx}}$ do 3º Cultivo é 2,38 vezes maior que o $\mu_{\text{máx}}$ do 6º.

Estes resultados discordam dos encontrados por Andersen et al. (2003), os quais calcularam a velocidade específica de crescimento de uma linhagem de *R. mucilaginosa* ao avaliarem a influência da presença e do aumento das concentrações de ferro no meio de cultivo no crescimento da levedura. A mesma foi cultivada em biorreator, a 500 rpm e 0,8 vvm. O meio de cultivo possuía uma composição bastante complexa. A levedura obteve um $\mu_{\text{máx}}$ de $0,23 \text{ h}^{-1}$ quando houve suprimento de ferro. Esse valor de velocidade de crescimento é maior do que os encontrados neste trabalho. Tanto a composição do meio como a presença do mineral estudado parecem ter influenciado neste dado, pois tais cultivos também foram bastante agitados e, portanto, contaram com o fornecimento de oxigênio.

O maior valor de $Y_{x/s}$ foi encontrado no Cultivo 6, com 0,630. Isso quer dizer que 63% de glicose foi utilizado na formação de células. O menor valor foi obtido pelo Cultivo 1, no qual apenas 29% foi convertido em células. Neste caso, o fornecimento de oxigênio por agitação e aeração parece ter influenciado totalmente nestas conversões, pois, diante das condições testadas no presente trabalho, utilizaram-se os maiores valores destes parâmetros para o Cultivo 6 (500 rpm e 2,5 vvm) e os menores para o Cultivo 1 (100 rpm e 1,0 vvm).

Schmidell (2001) afirma que, em fermentações industriais, embora esses fatores de conversão dependam da espécie do microrganismo, com relação a um determinado substrato, não dependem somente da natureza deste. Os demais componentes do meio também exercem influência sobre tais conversões, bem como o tempo de mistura e a transferência de oxigênio do sistema de agitação do biorreator. Além dessas influências, há de se considerar o fenômeno em que as células utilizam a energia de oxidação do substrato, não somente para o crescimento, mas também para finalidades de manutenção.

Na maioria das fermentações aeróbicas, a necessidade de transferência de oxigênio, fornecido pelo suprimento de ar ao cultivo na forma de bolhas, é um requisito importante para a sobrevivência das células. Enquanto a biomassa é baixa, o oxigênio não é um fator limitante. No entanto, quando a concentração de células aumenta, o oxigênio deve ser fornecido em um volume suficiente para satisfazer a formação do produto e crescimento celular (SCHAEPE et al., 2013).

Silva et al. (2001) estudaram a influência de agitação e aeração na produção de hexoquinase pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e concluíram

que as melhores condições de aeração são as de vazão moderada de ar, resultando em um K_{La} da ordem de 60 h^{-1} . Neste caso, a enzima teve sua formação afetada pela utilização de vazões maiores de oxigênio, o que seria devido à saturação da via respiratória pelo oxigênio. No presente trabalho, a maior atividade enzimática foi encontrada com um K_{La} de 121 h^{-1} e valores superiores pareceram indiferentes para a produção de proteases. Então, além de não se tratar da mesma enzima, foi enfatizado anteriormente que diversos fatores além do fornecimento de oxigênio podem influenciar na atividade enzimática, como composição do meio e condições de cultivo.

De acordo com Garcia-Ochoa e Gomez (2009), a determinação do K_{La} em biorreatores é essencial a fim de estabelecer a eficiência de aeração e quantificar os efeitos das variáveis operacionais sobre a oferta de oxigênio dissolvido. Além do mais, com esse valor definido, é possível reproduzir experimentos em outros instantes. Portanto, o valor do K_{La} do 6º Cultivo deverá ser recalculado para que se tenha uma maior confiabilidade dos resultados e garantir a reprodução deste trabalho.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho avaliou a influência do fornecimento de oxigênio em cultivos de *R. mucilaginosa* L07 realizados em biorreator, por meio de agitação e aeração. O resultado mostrou-se positivo com relação à atividade proteolítica, pois observou-se que esta aumentou em quase quatro vezes, comparando-se aos resultados obtidos com cultivos realizados em agitador rotatório. A maior atividade proteolítica foi obtida a 500 rpm e 1,5 vvm. Sugere-se que novos experimentos sejam realizados, testando outros meios de cultivo e estabelecendo o controle do pH, para avaliar se a atividade proteolítica é influenciada pela composição do meio. Ademais, faz-se necessária a identificação da classe das proteases, bem como a sua quantificação, a fim de aplicá-las em fins industriais e obter outros dados relacionados aos parâmetros cinéticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A.T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, v.40, p.2985–2991, 2005.

AMARAL, P.F.F.; ROCHA-LEÃO, M.H.M.; MARRUCHO, I.M.; COUTINHO, J.A.P.; COELHO, M.A.Z. Improving lipase production using a perfluorocarbon as oxygen carrier. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1368-1374, 2006.

ANDERSEN, D.; RENSHAW, J.C.; WIEBE, M.G. Rhodotorulic acid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Mycological Research**, v.107, n.8, p.949–956, 2003.

ARAUZ, L.J. **Produção de nisina em leite desnatado diluído por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 em biorreator**. São Paulo, Brasil, 148f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2011.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering**, McGraw Hill, 1986.

BALACHANDRAN, C.; DURAIKANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. Purification and characterization of protease enzyme from actinomycetes and its cytotoxic effect on cancer cell line (A549). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.2, n.1, p.1138-S1146, 2012.

BARATTO, C.M.; SALAMONI, S.P.; COSTA, R.; OLIVEIRA, C.B.; LOCATELLI, G.O. Seleção de microrganismos produtores de enzimas hidrolíticas isolados da região do meio oeste de Santa Catarina, Brasil. **Evidência**, v.11, n.2, p.15-28, 2011.

BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; SILVA, M.V.A.; LEITÃO, V.S.F.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 20, p.463-488, 2008.

BUSTAMANTE, M.C.C.; CERRI, M.O.; BADINO, A.C. Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers. **Chemical Engineering Science**, v.90, p.92-100, 2013.

CARRASCO, M.; ROZAS, J.M.; BARAHONA, S.; ALCAÍNO, J.; CIFUENTES, V.; BAEZA, M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the subAntarctic region. **BMC Microbiology**, v.12, p.1-9, 2012.

CARVALHO, P.O.; CALAFATTI, S.A.; MARASSI, M.; SILVA, D.M.; CONTESINI, F.J.; BIZACO, R. Potencial de biocatálise enantiosseletiva de lipases microbianas. **Química Nova**, v.28, n.4, p.614-621, 2005.

CASTRO, H.F.; MENDES, A.A.; SANTOS, J.C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

CERRI, M.O. **Hidrodinâmica e transferência de oxigênio em três biorreatores airlift de circulação interna geometricamente semelhantes**. São Carlos, Brasil, 157f. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 2009.

CERRI, M.O.; BADINO, A.C. Shear conditions in clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus* in stirred tank and airlift bioreactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.35, p.977–984, 2012.

CHARLES, M. Fermenter design and scale-up. In: MOO-YOUNG, M.; **Comprehensive biotechnology: the principles, applications & regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Pergamon Press, USA, p.57-75, 1985.

CHARNEY, J. TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **The Journal of Biologic Chemistry**, v.171, p.501-505, 1947.

CHAUD, L.C.S. **Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica visando à produção de proteases**. Lorena, Brasil, 124f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2014.

CHENNUPATI, S.; POTUMARTHI, R.; RAO, M.G.; MANGA, P.L.; SRIDEVI, M.; JETTY, A. Multiple Responses Optimization and Modeling of Lipase Production by *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC-8737 Using Response Surface Methodology. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.159, p.317-329, 2009.

CHUNLI, Z.; JITI, Z.; JING, W.; JING, W.; BAOCHENG, Q. Isolation and characterization of a nitrobenzene degrading yeast strain from activated sludge. **Journal of Hazardous Materials**, v.160, n.1, p.194–199, 2008.

COWAN, D.A.; TOW, L.A. Endangered antarctic environments. **Annual Review of Microbiology**, v.58, p.649-690, 2004.

DASU, V.V.; PANDA, T.; CHIDAMBARAM, M. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. **Process Biochemistry**, v.38, p. 877-880, 2003.

DE MORAIS, S.M.F. **Tolerância alcoólica, atividade fermentativa e permeabilidade celular em *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, Brasil, 109f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1984.

DONINI, I.A.N.; DE SALVI, D.T.B.; FUKUMOTO, F.K.; LUSTRI, W.R.; BARUD, H.S.; MARCHETTO, R.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S.J.L. Biossíntese e recentes avanços na produção de celulose bacteriana. **Eclética Química**, v.35, n.4, p.165 – 178, 2010.

DUARTE, A.W.F.; DAYO-OWOYEMI, I.; NOBRE, F.S.; PAGNOCCA, F.C.; CHAUD, L.C.S.; PESSOA, A.; FELIPE, M.G.A.; SETTE, L.D. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v.17, p.1023–1035, 2013.

ENGEL, S.; JENSEN, P.R.; FENICAL, W. Chemical ecology of marine microbial defense. **Journal of Chemical Ecology**, v.28, n.10, p. 1971-1985, 2002.

ESPERANÇA, M.N.; CUNHA, F.M.; CERRI, M.O.; ZANGIROLAMI, T.C.; FARINAS, C.S.; BADINO, A.C. Gas hold-up and oxygen mass transfer in three pneumatic bioreactors operating with sugarcane bagasse suspensions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.37, p.805–812, 2014.

FUNG, H. B. MARTYN, C.A.; SHAHIDI, A.; BROWN, S.T. *Rhodotorula mucilaginosa* lymphadenitis in an HIV-infected patient. **International Journal of Infectious Diseases**, v.13, n.1, p.27–29, 2009.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v.27, p.153-176, 2009.

JIANG, Y; LI, H.B.; CHEN, F.; HYDE, K.D. Production potential of watersoluble Monascus red pigment by a newly isolated *Penicillium* sp. **Journal of Agricultural Technology**, v.1, p.113-126, 2005.

KAPNOOR, S.; MULIMANI, V.H. Production of α -Galactosidase by *Aspergillus oryzae* through Solid-state Fermentation and its Application in Soymilk Galactooligosaccharide Hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, n.1, p.211-218, 2010.

KARGI, F.; MOO-YOUNG, M. Transport phenomena in bioprocess. **Comprehensive Biotechnology**, v.2, p.5-56, 1985.

KENSY, F.; ENGELBRECHT, C.; BÜCHS, J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. **Microbial Cell Factories**, v.8, n.68, p.1-15, 2009.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 17-45, 2002.

LATTERMANN, C; BÜCHS, J. Microscale and miniscale fermentation and screening. **Current Opinion in Biotechnology**, v.35, p.1-6, 2015.

LEE, H.; TO, R.J.B.; LATTA, R.K.; BIELY, P.; SCHNEIDER, H. Some Properties of Extracellular Acetylxyln Esterase Produced by the Yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, n.12, p.2831-2834, 1987.

LI, M.; LIU, G.L.; CHI, Z.; CHI, Z.M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p.101-107, 2010.

LIBKIND, D.; PÉREZ, P.; SOMMARUGA, R.; DIÉGUEZ, M.C. FERRARO, M.; BRIZZIO, S.; ZAGARESEC, H.; BROOCKA, M.V. Constitutive and UV-inducible synthesis of photoprotective compounds (carotenoids and mycosporines) by freshwater yeasts. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.3, p.281-286, 2004.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: v.3, Edgard Blucher Ltda., 593p, 2001.

MAIANGWA, J.; ALI, M.S.M.; SALLEH, A.B.; RAHMAN, R.N.Z.R.A; SHARIFF, F.M.; LEOW, T.C. Adaptational properties and applications of cold-active lipases from psychrophilic bacteria. **Extremophiles**, v.18, n.6, 2014.

MAPARI, S.A.S.; THRANE, U.; MEYER, A.S. Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? **Trends in Biotechnology**, v.28, n.6, p.300-307, 2010.

MÉNDEZ, A.; PÉREZ, C.; MONTAÑÉZ, J.C.; MARTÍNEZ, G.; AGUILAR, C.N. Red pigment production by *Penicillium purpurogenum* GH2 is influenced by pH and temperature. **Journal of Zhejiang University**, v.12, n.12, p.961-968, 2011.

MOLINÉ, M.; FLORES, M.R.; LIBKIND, D.; DIÉGUEZ, M.C.; FARÍAS, M.E.; BROOCKA, M.V. Photoprotection by carotenoid pigments in the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: the role of torularhodin. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v.9, p.1145-1151, 2010.

MOORE, M.M. The Role of Carotenoids in Preventing Oxidative Damage in the Pigmented Yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.270, n.2, p.419-431, 1989.

MÜLLER, S.; MURRAY, D.B.; MACHNE, R. A New Dynamic Model for Highly Efficient Mass Transfer in Aerated Bioreactors and Consequences for K_{La} Identification. **Biotechnology and Bioengineering**, 2012.

NEUBAUER, P.; CRUZ, N.; GLAUCHE, F.; JUNNE, S.; KNEPPER, A.; RAVEN, M. Consistent development of bioprocesses from microliter cultures to the industrial scale. **Engineering in Life Sciences**, v.13, p.224-238, 2013.

NEVES, L.C.M. **Obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir de *S.cerevisiae* W303-181**. São Paulo, Brasil, 177f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2003.

NEW BRUNSWICK, **Guia de Operações Bioflo 110 Fermentor**: manual nº M1273-0054, New Brunswick Scientific Co., New Jersey, EUA, p.159, 2002.

NUNES, J.J.; BIZERRA, F.C.; FERREIRA, R.C.; COLOMBO, A.L. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Profile, and Biofilm Formation of Clinical and Environmental *Rhodotorula* Species Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n.1, p.382–389, 2013.

OGRYDZIAK, D. M. Yeast extracellular proteases. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, n.1, p.1–55, 1993.

PASTOR, M.D.; LORDA, G.S.; BALATTI, A. Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p. 6-9, 2001.

PERRIER, V.; DUBREUCQ, E.; GALZY, P. Fatty acid and carotenoid composition of *Rhodotorula* strains. **Archives of Microbiology**, v.164, p.173-179, 1995.

PIRT, J. **Principles of microbe and cell cultivation**. New York, John Wiley, 1975.

POTUMARTHI, R.; SUBHAKAR, C.; VANAIAKSHI, J.; JETTY, A. Effect of Aeration and Agitation Regimes on Lipase Production by Newly Isolated *Rhodotorula mucilaginosa*– MTCC 8737 in Stirred Tank Reactor Using Molasses as Sole Production Medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.151, p.700–710, 2008.

QUIJANO, G.; HERNANDEZ, M.; VILLAVERDE, S.; THALASSO, F.; MUÑOZ, R. A step-forward in the characterization and potential applications of solid and liquid oxygen transfer vectors. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.85, p.543-551, 2010.

SAHAY, S.; HAMID, B.; SINGH, P.; RANJAN, K.; CHAUHAN, D.; RANA, R.S.; CHAURSE, V.K. Evaluation of pectinolytic activities for oenological uses from psychrotrophic yeasts. **Letters in Applied Microbiology**, v.57, p.115–121, 2013.

SANTOS, S. **Cinética do cultivo em biorreator de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C**. São Paulo, Brasil, 155f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2007.

SCHAEPE, S.; KUPRIJANOV, A.; SIEBLIST, C.; JENZSCH, M.; SIMUTIS, R.; LÜBBERT, A. $k_L a$ of stirred tank bioreactors revisited. **Journal of Biotechnology**, v.168, n.4, p.576-83, 2013.

SCHIMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, São Paulo: v.2, Edgard Blücher Ltda., 562p, 2001.

SHIVAJI, S.; PRASAD, G.S. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: SATYANARAYANA T.; KUNZE, G. **Yeast biotechnology: diversity and applications**. Springer, Amsterdam, p.3-18, 2009.

SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91, n.3, p.605-613, 2001.

SILVEIRA, J.M.J.; FUTINO, A.M.; OLALDE, A.R. Biotecnologia: corporações, financiamento da inovação e novas formas organizacionais. **Revista Economia e Sociedade**, v.11, n.1, p.129-164, 2002.

SINGH, S.K.; GARG, S.K. Shake-flask and bench-scale stirred tank bioreactor production optimization of a thermoalkaline protease from *Bacillus cereus* SIU1 using one-factor-at-a-time and response surface (statistical) methodologies. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.32, n.3, p.173-187, 2014.

SIVAPRAKASAM, S.; MAHADEVAN, S.; GOPALARAMAN, S. Oxygen mass transfer studies on batch cultivation of *P. aeruginosa* in a biocalorimeter. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.11, n.1, 2008.

SMITH, P.K.; KROHN, R.I.; HERMANSON, G.T.; MALLIA, A.K.; GARTNER, F.H.; PROVENZANO, M.D.; FUJIMOTO, E.K.; GOEKE, N.M.; OLSON, B.J.; KLENK, D.C. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**, v.50, p.76-86, 1985.

SQUINA, F.M.; MERCADANTE, A.Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.39, n.3, p. 309-318, 2003.

STROBEL, G.A. Endophytes as sources of bioactive products. **Microbes and Infection**, v.5, p.535-544, 2003.

TRAGER, M.; QAZI, G.N.; ONKEN, U.; CHOPRA, C.L. Comparison of Airlift and Stirred Reactors for Fermentation with *Aspergillus niger*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.68, n.2, p.112-116, 1989.

THERON, L.W.; DIVOL, B. Microbial aspartic proteases: current and potential applications in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.8853-8868, 2014.

VAZ, A.B.M.; ROSA, L.H.; VIEIRA, M.L.A.; GARCIA, V.; BRANDÃO, L.R.; TEIXEIRA, L.C.R.S.; MOLINÉ, M.; LIBKIND, D.; BROOCK, M.V.; ROSA, C.A. The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in antarctica. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.42, p.937-947, 2011.

ZHANG, X.N.; RAN, Q.Q.; ZHANG, X. Screening and Identification of a Cutinase-Producing *Rhodotorula mucilaginosa* and Properties of the Cutinase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.175, p.1221-1233, 2015.

ZHENG, C.; ZHOU, J.; WANG, J.; QU, B.; WANG, J.; LU, H.; ZHAO, H. Aerobic degradation of nitrobenzene by immobilization of *Rhodotorula mucilaginosa* in polyurethane foam. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p.298-303, 2009.

ZIMMER, C.; PLATZ, T.; CADEZ, N.; GIFFHORN, F.; KOHRING, G.W. A cold active (2R,3R)-(-)-di-O-benzoyl-tartrate hydrolyzing esterase from *Rhodotorula mucilaginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.73, p.132–140, 2006.

ZOZ, L.; CARVALHO, J.C.; SOCCOL, V.T.; CASAGRANDE, T.C.; CARDOSO, L. Torularhodin and Torulene: Bioproduction, Properties and Prospective Applications in Food and Cosmetics - a Review. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, p.1-11, 2014.