**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

Luciana Cristina Silveira Chaud

**Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica
visando à produção de proteases**

Lorena-SP

2014

Luciana Cristina Silveira Chaud

Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica visando à
produção de proteases

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de
microbiologia aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças de
Almeida Felipe

Co-orientador: Prof. Dr. Adalberto Pessoa
Júnior

Versão corrigida e reimpressa

Lorena - SP

2014

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Chaud, Luciana Cristina Silveira

Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica visando à produção de proteases. / Luciana Cristina Silveira Chaud. - Versão corr. reimpr. - 2014.

109 p.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientador: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Proteases microbianas 2. *Rhodotorula mucilaginosa* 3. Leveduras (Antártica) 4. Microrganismos psicrófilos e psicrotolerantes 5. Biodiversidade microbiana. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

663.1 - CDU

*Ao meu marido Maurício, que nestes anos foi
pai, mãe, provedor, administrador,
cozinheiro, arquiteto, amigo e amante,
médico e louco no caminho do amor
verdadeiro.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o mentor maior, aquele que dá a vida e nos orienta e à nossa querida mãe Maria Imaculada, que com seus exemplos nos ensinou a persistência e a paciência.

Agradeço à minha família, principalmente ao meu marido Maurício e meus filhos queridos, Felipe e Mariana, grandes incentivadores, que acreditaram desde o princípio.

Muito obrigada à minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças, por todo o tempo e carinho que me dedicou durante o período do doutorado, com sua orientação precisa e generosa.

Também agradeço ao Prof. Dr. Adalberto Pessoa Júnior, pela oportunidade de conduzir este trabalho e por suas sugestões e ensinamentos, sempre bem vindos.

Agradeço à Profa. Dra. Lara D. Sette, pela oportunidade de trabalhar com algo tão especial e inovador e por suas orientações pertinentes.

Agradeço à Profa. Dra. Rafaella Bonugli pelo auxílio despretensioso nos momentos críticos.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, agradeço pelas orientações pacientes e precisas desde o início deste trabalho.

Às minhas queridas amigas, Débora, Kelly, Adriana e Elisângela, que estiveram sempre ao meu lado. Nem todas as palavras seriam suficientes para agradecê-las, pois simplesmente estavam lá.

Às amigas Pâmela e Bruna, que muito contribuíram para a execução deste trabalho.

Agradeço à querida xará estrangeira Luciana Lario, pelos conselhos e pela parceria.

A todos os colegas que fiz durante o período que estive em Lorena, que contribuíram de uma ou outra maneira para o desenvolvimento deste trabalho, seja com materiais, insumos, equipamentos, informações, companhia ou mesmo com suas palavras de apoio e carinho.

Agradeço também aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, sempre prontos a ajudar com o que fosse solicitado, desde uma simples folha de papel até a limpeza caprichosa do laboratório.

Por fim, meus mais sinceros agradecimentos à Universidade de São Paulo - Escola de Engenharia de Lorena, à CAPES e à FAPESP, os quais sem o apoio financeiro e estrutural, este trabalho não seria possível.

*"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas,
Que já têm a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos,
Que nos levam sempre aos mesmos lugares.
É o tempo da travessia e se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre,
À margem de nós mesmos."*

Fernando Pessoa

RESUMO

CHAUD, L.C.S. **Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica visando à produção de proteases**, 2014. 109 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Micro-organismos oriundos de ecossistemas restritivos e pouco explorados como o continente Antártico têm despertado grande interesse na comunidade científica, visto que pesquisas biotecnológicas podem resultar em produtos de alto valor agregado. Dentre estes produtos, enzimas de psicrófilos ou psicrotolerantes, que apresentam alta atividade catalítica aliada à flexibilidade, estimulam a busca de condições que favoreçam a sua produção. Assim, as proteases se destacam neste universo, visto que respondem por cerca de 60% do mercado mundial de enzimas. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi o de selecionar, dentre os isolados de diferentes amostras do continente Antártico, leveduras produtoras destas enzimas, bem como de estabelecer condições de cultivo laboratorial para o favorecimento da atividade proteolítica. Foram utilizadas 99 leveduras previamente isoladas na Divisão de Recursos Microbianos da Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria da UNICAMP, das quais 14,14% (n= 14) foram selecionadas como produtoras de proteases por meio de ensaios em placas contendo ágar Sabouraud com leite desnatado (10%). O perfil da atividade proteolítica extracelular, o crescimento e o consumo de açúcar das leveduras selecionadas foram avaliados a partir do cultivo das mesmas em caldo Sabouraud, pH 5,5, a 150rpm, a 25°C por 120h. Todos os isolados selecionados mostraram alguma atividade proteolítica em meio líquido. A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07 foi então selecionada para a etapa seguinte, em função da máxima atividade proteolítica (33,36 U.mL⁻¹) observada em meio líquido. Para avaliar o impacto da suplementação do meio de cultivo e da variação de parâmetros físico-químicos sobre a atividade proteolítica desta levedura, e ainda visando o favorecimento da produção de proteases, foi utilizado o planejamento fatorial fracionado 2⁶⁻², seguido de planejamento fatorial completo (DCCR 2³). Os resultados obtidos permitiram estabelecer um modelo matemático que foi validado, elevando a atividade proteolítica inicial em 45,53%. A caracterização da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07 revelou seu caráter ácido, cuja máxima atividade (71,14 U.mL⁻¹) foi obtida em pH 5,0 a 50°C. Verificou-se ainda que 70% da atividade proteolítica foi conservada quando os ensaios foram realizados a 37°C e 80% em 45 e 60°C. Esta enzima mostrou-se altamente estável após incubação por 1h em temperaturas até 50°C, verificando-se a manutenção da atividade proteolítica. Estas características combinadas com a atividade proteolítica sugerem que esta protease exibe potencial para ser utilizada em processos biotecnológicos.

Palavras-chave: Proteases microbianas, *Rhodotorula mucilaginosa*, Leveduras (Antártica), Micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes, Biodiversidade microbiana.

ABSTRACT

CHAUD, L.C.S. **Establishment of conditions for cultivation of yeasts isolated in Antarctica aimed at the production of proteases**, 2014. 109p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Microorganisms from restrictive and unexplored ecosystems as the Antarctic continent have been of great interest in the scientific community, because they can synthesize biotechnological products with high added value. Among these products, psychrotolerants or psychrophilic enzymes, which present high activity coupled with flexibility, stimulates the studies regarding to optimize conditions in order to favor their production. Proteases are highlighted in this universe, because that account for about 60 % of the enzymes world market. In this context, the aim of this work was to select among microorganisms strains isolated from Antarctica, specifically protease-producing yeast, as well as establishing its growth conditions at laboratory scale focusing on its proteolytic activity. Ninety-nine previously isolated yeasts (DRM CPQBA / UNICAMP), from different samples of the Antarctic continent were evaluated and 14,14% (n = 14) were selected as protease producers in Sabouraud Agar containing skim milk(10%). The profile of the extracellular proteolytic activity, growth conditions and sugar consumption by selected yeast strains was reported in Sabouraud broth at pH 5.5, agitation rate of 150 rpm, 25 ° C for 120h. The results showed that all selected strains presented proteolytic activity. The maximum activity values was observed with *Rhodotorula mucilaginosa* L07 (33,36 U.mL⁻¹), which was selected to continue the experiments. In the next step it was studied the effect of nutrients supplementation of the culture medium and the variation of physicochemical parameters on the proteolytic activity of *R. mucilaginosa* L07 by using an experimental design consisting of 2⁶⁻² fractional factorial followed by a full factorial design (CCRD 2³). The results obtained allowed to stablish a mathematical model, which was validated, allowing the increase of the initial proteolytic activity in 45.53%. Characterization of protease produced by *R. mucilaginosa* L07 showed an acid character, and a maximum activity of 71.14 U.ml⁻¹ was obtained at pH 5.0 at 50°C. It was also found that 70% of the proteolytic activity was preserved when the assays were performed at 37°C and 80% at 45 and 60°C. This enzyme was highly stable after incubation at temperatures ≤ 50°C/ 1 h, maintaining the proteolytic activity. These characteristics combined with enzymatic activity, suggests that this protease exhibits potential use in biotechnological processes.

Keywords: Proteases from microorganisms, *Rhodotorula mucilaginosa*, Yeasts (Antarctica), Psychrophilic and psychrotolerants microorganisms, Microbial biodiversity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Mapa do continente Antártico, evidenciando a localização de três regiões de amostragem: península Antártica, ilha Ross e vales secos de McMurdo.....	22
Figura 3.2 - Mecanismos de estabilização da estrutura da proteína, que podem sofrer alterações visando o aumento da flexibilidade.....	27
Figura 3.3 - Resíduos dos aminoácidos evidenciando as cadeias laterais (grupos R=): (A) prolina (grupo R polar não carregado), (B) arginina (grupo R polar carregado positivamente) e (C) glicina (grupo R não polar), que podem ser reduzidos (A e B) ou agrupados (C) em enzimas psicrófilas.....	27
Figura 3.4 - Esquema de uma reação de hidrólise da ligação peptídica em proteínas (—), catalisada por uma protease, onde: X^1 = cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal; X^2 = cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal; R_1 , R_2 = cadeias laterais.....	31
Figura 3.5 - Representação dos elementos estruturais de todas as peptidases aspárticas. A linha vermelha da fita leva ao domínio N-terminal, enquanto a linha azul leva ao domínio C-terminal. Cada elemento no domínio N-terminal é espelhado por um elemento semelhante no domínio C-terminal. (A) Vista frontal da estrutura do sítio ativo.(B) Vista da estrutura girada 90° (visão do fundo da molécula).....	33
Figura 3.6 - Distribuição do mercado mundial de enzimas. As porções com asterisco (*) representam o mercado de proteases.....	35
Figura 4.1 - Representação esquemática da diluição seriada utilizada para definir a melhor diluição e temperatura para individualização das colônias de leveduras produtoras de proteases.....	55
Figura 5.1 - Imagens de microscopia óptica (microscópio óptico binocular LABO) de alguns isolados originais: (A) lâminas à fresco (magnificação de 400x) e (B) células coradas com fucsina (magnificação de 1000x).....	64
Figura 5.2 - Evidências fotográficas da formação do halo indicativo da produção de proteases, nas placas de cultivo selecionadas.....	67
Figura 5.3 - Número de leveduras protease-positivas em função da espécie identificada.....	70
Figura 5.4 - Proporção de leveduras protease-positivas em relação à fonte de coleta no continente Antártico.....	70
Figura 5.5 - Atividade proteolítica das leveduras protease-positivas isoladas em diferentes fontes do continente Antártico, sobre o substrato Azocazeína 1%, em função do tempo de cultivo a 25°C em Caldo Sabouraud.....	72
Figura 5.6 - Atividade proteolítica (■), produção de biomassa (■), consumo de glicose (■), produção de etanol (■) e glicerol (■) pelas leveduras protease-positivas, isoladas do continente Antártico, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C.....	74

Figura 5.7 – Velocidade específica de crescimento celular (μX) (■) e de produção de protease extracelular (μp) (■) das leveduras isoladas no continente Antártico em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C....	76
Figura 5.8 - Diagrama de Pareto, onde se observa o efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) de 6 variáveis na produção de proteases por <i>R. mucilaginosa</i> L07.....	81
Figura 5.9 - Atividade proteolítica (■) e biomassa (■) da levedura <i>R. mucilaginosa</i> L07, em cultivos realizados por meio de planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , após 120h de cultivo a 150rpm.....	84
Figura 5.10 - Evidências fotográficas da despigmentação da levedura <i>R. mucilaginosa</i> L07, proveniente da Antártica: (A) Colônias em meio ágar Sabouraud com leite (10%); (B) Repiques em agar Sabouraud ao longo do tempo (12/12, 02/13, 03/13 e 05/13); (C) Evidência em maior escala dos repiques realizados em 12/12 e 05/13.....	85
Figura 5.11 - Superfície de resposta para a produção de proteases por <i>R. mucilaginosa</i> L07, em relação à concentração de farelo de arroz e peptona.....	88
Figura 5.12 - Superfície de resposta para a produção de proteases pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> L07, em relação à concentração de peptona e glicose.....	88
Figura 5.13 - Atividade proteolítica de <i>R. mucilaginosa</i> L07, em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições previstas pelo modelo e no experimento controle (DCCR $2^3 - E1$).....	91
Figura 5.14 - Consumo de glicose (linhas descontínuas) e produção de biomassa (linhas contínuas) por <i>R. mucilaginosa</i> L07, em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições previstas pelo modelo e no experimento controle (DCCR $2^3 - E1$).....	91
Figura 5.15 - (A) Proteínas totais (BRADFORD, 1976), (B) Atividade específica (U.mg ⁻¹). Determinado no extrato livre de células em função do tempo de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2^3 de <i>R. mucilaginosa</i> L07.....	92
Figura 5.16 - Atividade proteolítica extracelular de <i>R. mucilaginosa</i> L07, no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2^3 , em função da variação da temperatura do ensaio sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.....	94
Figura 5.17 - Atividade proteolítica extracelular de <i>R. mucilaginosa</i> L07, determinada no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2^3 , em função da variação do pH do ensaio (5,0-8,0) sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão McIlvane, em temperatura ótima (50°C).....	95
Figura 5.18 - Atividade proteolítica residual, após 1h e 3h de incubação do extrato livre de células de <i>R. mucilaginosa</i> L07 (obtido no teste do modelo proposto pelo DCCR 2^3) em diferentes temperaturas (10-70°C), sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Comparação estrutural e composicional de elementos característicos de enzimas adaptadas ao frio com seus homólogos mesófilos, por meio de dedução por Raios-X. Códigos utilizados: (+) : presença da característica estrutural ou composicional; (-) : ausência da característica estrutural ou composicional; 0 : sem diferenças significativas entre enzimas adaptadas ao frio e seus homólogos termoestáveis; X : não examinado; Glu+Asp: Glutamato+Aspartato; Lis+Arg: Lisina+Arginina; Arg+Lis: Arginina +Lisina.....	28
Tabela 3.2 - Classificação de proteases de acordo com o sítio ativo. Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica e círculos fechados indicam os aminoácidos terminais. As estrelas indicam os grupos terminais bloqueados.....	32
Tabela 3.3 - Exemplos de micro-organismos produtores de proteases em que a produção máxima ocorreu em diferentes parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) de cultivo.....	39
Tabela 3.4 - Composição química de subprodutos do beneficiamento do arroz.....	43
Tabela 3.5 - Características de proteases purificadas, produzidas por fungos mesófilos e psicotolerantes.....	52
Tabela 4.1 - Linhagens de leveduras da Antártica isoladas no CPQBA/ UNICAMP e suas respectivas fontes de isolamento (*).....	53
Tabela 4.2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} com ponto central.....	57
Tabela 4.3 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} com triplicata no ponto central (valores codificados), para identificar as variáveis significativas para a produção de proteases pelo isolado com maior atividade proteolítica.....	58
Tabela 4.4 - Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2^3 (DCCR).....	59
Tabela 4.5 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central (DCCR), visando otimização da atividade proteolítica pela levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L07.....	59
Tabela 4.6 - Condições de cultivo de <i>R. mucilaginosa</i> L07 para validação do modelo proposto pelo DCCR 2^3 : (A) Condição de cultivo que resultou em maior (y) predito e (B) experimento controle (ensaio 1 do DCCR 2^3). Os cultivos foram realizados em pH 4,0 e 10°C, a 150 rpm por 120h.....	60
Tabela 5.1 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC.ml ⁻¹) após o plaqueamento dos isolados selecionados (L02, L07 e L26) em diferentes diluições seriadas.....	65
Tabela 5.2 - Isolados de leveduras selecionados à partir da formação de halo transparente ao redor da colônia, indicativo da produção de proteases (+) ou (-), fonte de isolamento da levedura e diâmetro do halo encontrado após 120h.....	69
Tabela 5.3 - Planejamento Fatorial Fracionado 2^{6-2} para avaliação da influência de 6 fatores (valores reais) sobre a atividade proteolítica extracelular da levedura <i>R. mucilaginosa</i> L07, após cultivo por 120h.....	80

Tabela 5.4 - Estimativa dos efeitos das variáveis avaliadas no Planejamento Fatorial Fracionado 2^{6-2} , ao nível de significância de 10% ($p < 0,1$), para a produção de proteases pela levedura <i>R. mucilaginosa</i> L07 proveniente da Antártica.....	80
Tabela 5.5 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) após 120h de cultivo, resposta predita, erro absoluto e erro relativo.....	86
Tabela 5.6 - Coeficiente de regressão do planejamento experimental completo 2^3	87
Tabela 5.7 - ANOVA do modelo quadrático para a produção de proteases pela levedura <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L07).....	87

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3.	REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1	Ecossistemas Antárticos e Diversidade Microbiana	22
3.2	Estratégias microbianas de adaptação ao frio	25
3.3	Proteases: Propriedades e Aplicações	31
3.4	Produção de proteases por micro-organismos	38
3.5	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	47
3.6	Caracterização parcial de proteases de micro-organismos: estabilidade e condições ótimas para a atividade proteolítica	49
4.	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	Micro-organismos	53
4.2	Viabilidade celular e pureza das culturas	54
4.3	Seleção de leveduras produtoras de proteases	54
4.4	Cultivo de isolados de leveduras protease-positivos	55
4.4.1	Preparo do inóculo e condições de cultivo	55
4.5	Estabelecimento de condições de cultivo para o favorecimento da produção de proteases pela levedura selecionada	56
4.6	Determinação da concentração de proteína solúvel	60
4.7	Caracterização parcial da protease produzida por <i>R. mucilaginosa</i> L07	60
4.8	Métodos analíticos	61
4.8.1	Determinação da concentração celular	61
4.8.2	Determinação da concentração de glicose, etanol e glicerol	61
4.8.3	Determinação de pH	61
4.8.4	Determinação da atividade proteolítica	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Viabilidade e pureza dos isolados de leveduras da Antártica	63
5.2	Diluição seriada para a seleção de leveduras proteolíticas isoladas na Antártica	63
5.3	Seleção de leveduras produtoras de proteases	65
5.4	Avaliação da atividade proteolítica das leveduras selecionadas	71
5.5	Estabelecimento de condições de cultivo para o favorecimento da produção de proteases pela levedura selecionada	79
5.6	Caracterização parcial da protease produzida por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> L07	93
6.	CONCLUSÃO	98
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	99
	REFERÊNCIAS	100
	APÊNDICE	111

1. INTRODUÇÃO

Micro-organismos derivados de ambientes extremos tem sido foco de grande interesse para pesquisas pelas características destes, como a biodiversidade e resistência às condições climáticas e geográficas. Neste contexto os fungos derivados de nichos ecológicos pouco explorados como o ambiente Antártico despertam particular interesse, principalmente pelo pouco conhecimento sobre a biodiversidade das espécies que habitam esses ecossistemas. Considerando que os trabalhos de pesquisa nesta área são escassos, principalmente quanto ao isolamento e avaliação do potencial biotecnológico de fungos pertencentes a este ambiente, tanto os terrestres quanto os marinhos, é importante intensificar os trabalhos nesta área do conhecimento.

Nesta perspectiva, o Brasil tem incentivado as atividades de pesquisas na Antártica, objetivando a geração de conhecimentos e a utilização dos organismos que habitam esses ecossistemas. O estabelecimento de um programa de prospecção biotecnológica de organismos marinhos e terrestres na região Antártica, visando identificação de recursos genéticos com potencial econômico foi uma diretriz prioritária do Plano de Ação (2007-2010) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT). Em cinco de maio de 2014, foi apresentado o Plano de Ação Ciência Antártica para o Brasil 2013-2022, pelo secretário de Políticas e Programas do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), Carlos Nobre, na 37ª Reunião Consultiva do Tratado da Antártica, em Brasília. Este plano de ação visa aumentar a produtividade e qualidade da ciência nacional relacionada ao continente Antártico.

Especificamente quanto à utilização de enzimas de origem microbiana com aplicações ambientais e/ou industriais, esta se encontra em contínua ascensão uma vez que tais enzimas podem ser utilizadas em uma ampla variedade de processos, como, por exemplo, nas indústrias de alimentos, medicamentos, detergentes, química fina e também no processamento de resíduos industriais. No caso da produção de enzimas a partir de micro-organismos psicrófilos ou psicrotolerantes, há perspectiva de diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial, o que pode movimentar a bioeconomia e favorecer o desenvolvimento biotecnológico. Além disso, uma importante

característica destas enzimas é a correlação da alta atividade catalítica e a termolabilidade, o que pode representar uma vantagem em processos que requerem elevado rendimento ou a necessidade de rápida inativação enzimática pelo aumento de temperatura.

A característica de alta atividade catalítica, aliada à baixa estabilidade das enzimas adaptadas ao frio, pode ser parcialmente explicada pelo aumento da flexibilidade da molécula, em comparação com enzimas mesófilas e termófilas e já foi observada em alguns grupos enzimáticos como das proteases, o qual é um dos mais importantes e versáteis grupos de enzimas comerciais.

Dentre os diferentes micro-organismos produtores de proteases, estudos apontam para um grande interesse na exploração de extremófilos para aplicações industriais, uma vez que estes apresentam características não convencionais, desenvolvidas pela necessidade de resistência às condições desfavoráveis de seu ambiente de origem. Estas pesquisas são ainda prioritariamente realizadas empregando-se meios de cultivo sintéticos ou semissintéticos, sendo bem conhecido que a produção de proteases por micro-organismos é influenciada por diferentes parâmetros de cultivo, como temperatura, pH, concentração de sais, de alguns íons e nutrientes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas na Antártica com potencial para a produção de proteases.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar leveduras produtoras de proteases, a partir do isolamento de colônias em placas.
- Avaliar o perfil da atividade proteolítica extracelular, crescimento e consumo de açúcar das leveduras da Antártica selecionadas, durante cultivo em caldo Sabouraud.
- Identificar a levedura com maior atividade proteolítica, por meio do cultivo em frascos agitados.
- Estabelecer condições de cultivo que propiciem o favorecimento da produção de proteases pela levedura selecionada com maior atividade proteolítica.
- Caracterizar parcialmente a protease produzida nas condições otimizadas.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ecossistemas Antárticos e Diversidade Microbiana

A Antártica (Figura 3.1) é um continente remoto e inóspito, possuindo o clima mais frio e seco conhecido do planeta Terra (RUISI et al., 2006). Mais de 99% do continente Antártico está coberto de gelo durante todo o ano, destacando-se as baixas temperaturas, que variam nos vales secos de McMurdo entre -20°C a -50°C no inverno (ROGERS, 2007; ARENZ; BLANCHETTE, 2011). Este continente apresenta ainda ventos fortes, alta sublimação e evaporação, elevada incidência de radiação, especialmente UV, alternados com prolongados períodos de escuro, os quais representam fatores limitantes para o desenvolvimento de qualquer forma de vida (ONOFRI et al., 2007; YERGEAU; KOWALCHUK, 2008; MARGESIN; MITEVA, 2011).

Figura 3.1 - Mapa do continente Antártico, evidenciando a localização de três regiões de amostragem: península Antártica, ilha Ross e vales secos de McMurdo

Fonte: Arenz e Blanchette, 2011.

Apesar das condições inóspitas desses ambientes, uma grande variedade de micro-organismos tem sido descoberta, incluindo representantes dos três domínios: Bacteria, Eucarya e Archaea (CAVICCHIOLI et al., 2002). Micro-organismos destes grupos

desenvolvem estratégias de adaptação para superar a influência direta ou indireta das baixas temperaturas (RUISI et al., 2006; BUZZINI et al., 2012).

Convencionalmente, micro-organismos adaptados ao frio podem ser divididos em psicrófilos obrigatórios e os facultativos (psicrotolerantes), sendo os obrigatórios incapazes de crescer acima de 20°C e cuja temperatura ótima de crescimento se encontra ao redor de 15°C, enquanto a mínima ao redor de 0°C ou menor. Em contraste, os facultativos, apesar de crescerem em temperaturas próximas do ponto de congelamento da água, apresentam maior taxa de crescimento acima de 20°C (BUZZINI et al., 2012). Não obstante estas considerações, segundo Onofri et al. (1999), foram encontrados fungos que podem ser psicrófilos ou psicrotolerantes, dependendo da estirpe. Muitos ambientes Antárticos recebem continuamente vários propágulos de micro-organismos de outras regiões, como indica a alta frequência de espécies cosmopolitas, particularmente as de maior proximidade, como as da América do Sul, que são dispersas por vetores como os ventos e animais (KAPPEN, 1993). Assim, alguns micro-organismos encontrados na Antártica, são representantes de espécies mesófilas capazes de crescer ativamente no verão antártico, evidenciando um comportamento adaptado ao clima frio (VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013).

A maior parte dos fungos que ocorrem na Antártica é cosmopolita, sendo alguns destes transportados para a Antártica, mas incapazes de crescerem sob as condições extremas ali encontradas, enquanto outros, chamados indígenas, estão bem adaptados, sendo capazes de crescer e se reproduzir mesmo em baixas temperaturas (RUISI et al., 2007). De acordo com Robinson (2001) a predominância de fungos com micélios estéreis (*mycelia sterilia*) em solos da Antártica poderia ser uma adaptação fisiológica para superar as temperaturas abaixo de zero. Em adição, a produção de melanina por esses fungos seria um mecanismo de proteção para a sobrevivência em temperaturas extremas e sob a alta incidência de radiação ultravioleta neste continente (ROBINSON, 2001).

A capacidade de tolerar ao binômio baixa temperatura e alta concentração salina é condição necessária à adaptação e sobrevivência de fungos a ambientes extremos de gelo glacial (RAY et al., 1992; ROBINSON, 2001; RUISI et al., 2007). Segundo Ruisi et al. (2007), as estratégias individuais de resistência às condições extremas não são específicas para um fator individual somente, mas sim para mais de uma condição adversa. Apesar de capacidades metabólicas variáveis e outras diferenças nas condições ambientais, o

elemento-chave de todos os micro-organismos adaptados ao frio é a superação bem sucedida dos efeitos negativos das baixas temperaturas, por meio de uma série de adaptações estruturais e funcionais (MARGESIN; MITEVA, 2011).

Dentre a diversidade de fungos terrestres encontrados na Antártica, a maioria é psicrotolerante (RUISI et al., 2007), tendo sido encontrados em amostras de solo os filamentosos pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma* (SINGH; PUJA; BHAT, 2006). Quanto às leveduras, destacam-se representantes das espécies *Leucosporidium antarcticum* (TURKIEWICZ et al., 2003), *Debaryomyces hansenii*, *Dipodascus australiensis*, *Cryptococcus albidosimilis*, *Malassezia restricta*, *Sporidiobolus salmonicolor* (ANENZ et al., 2006), *Rhodotorula rubra*, *Bullera alba*, *Candida humicola*, *C. famata*, *C. ingeniosa*, *C. auriculariae* (RAY et al., 1992) e *C. antarctica* (DOMINGUÉZ DE MARÍA et al., 2005), estando esta última espécie envolvida em inúmeros processos de patentes (JOSEPH et al., 2008).

Novas espécies fúngicas podem surgir a partir da exploração da biodiversidade microbiana Antártica, como as produtoras de insumos utilizados em vários setores tecnológicos (FENICE et al., 1997; ROBINSON, 2001). Neste caso têm-se as enzimas adaptadas ao frio, as quais possuem alta atividade específica em baixas temperaturas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica (CAVICCHIOLLI et al., 2002; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). O estudo destas tem sido estimulado visando diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial (GERDAY et al., 2000). Uma importante característica das enzimas adaptadas ao frio é a correlação entre a alta atividade catalítica e a termolabilidade, a qual pode ser parcialmente explicada pelo aumento da flexibilidade da molécula, em comparação com enzimas de micro-organismos mesófilos e termófilos (GEORLETTE et al., 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Assim, proteases, lipases, xilanases e amilases de psicrófilos vêm apresentando grande potencial comercial, principalmente por sua fácil recuperação, em virtude de serem em sua maioria, extracelulares (DOMINGUÉZ DE MARÍA et al., 2005; DUARTE et al., 2013).

A levedura extremófila *Candida antarctica* isolada em 1980 a partir de sedimentos do Lago Vanda na Antártica (lago permanentemente coberto por gelo) e produtora de lipase (DOMINGUÉZ DE MARÍA et al., 2005) é um excelente exemplo do grande potencial dos micro-organismos que habitam esse ambiente. Outro exemplo que remete à idéia da

potencialidade destes micro-organismos é a produção de proteases adaptadas a baixas temperaturas. Pesquisadores japoneses na Antártica isolaram micro-organismos terrestres e aquáticos, produtores de proteases e lipases adaptadas ao frio, que deram origem a diversas patentes para a produção de detergentes, as quais descrevem as proteases e os micro-organismos que as produzem (CAVICCHIOLI et al., 2002).

3.2 Estratégias microbianas de adaptação ao frio

A Terra é um planeta gelado, visto que em torno de 85% da biosfera está permanentemente exposta a temperaturas abaixo de 5°C. Apesar disto, micro-organismos podem ser encontrados em ambientes polares aquáticos e terrestres, devendo, para tanto, possuir processos celulares perfeitamente adaptados ao crescimento em baixas temperaturas (CAVICCHIOLI et al., 2002; MARGESIN; MITEVA, 2011).

A menor temperatura limitante para a vida é comumente definida como o ponto de congelamento da água celular (0°C). Porém, o cloreto de sódio e outros solutos menores, bem como glicoproteínas e peptídeos anticongelantes, podem diminuir ainda mais o ponto de congelamento dos fluidos corporais ou da água celular (FELLER; GERDAY, 1997). Entretanto, muitas adaptações celulares a baixas temperaturas e os mecanismos moleculares subjacentes, não foram ainda completamente elucidados, havendo necessidade de aprofundamento nos estudos sobre a regulação da fluidez da membrana, aspectos termodinâmicos ligados às reações enzimáticas e limitação de nutrientes (FELLER; GERDAY, 2003; MARGESIN; MITEVA, 2011). Apesar de tais restrições, de acordo com Margesin e Miteva (2011), os lagos permanentemente cobertos de gelo na Antártica são considerados “oásis” de vida no deserto polar, com alta densidade populacional de baixa complexidade. Além disso, foram encontradas comunidades microbianas também em rochas dos desertos secos da Antártica, bem como na neve e na calota polar, onde estes organismos são frequentemente expostos a uma forte radiação ultravioleta, temperatura média em torno de -20°C, limitação de nutrientes e por muitas vezes a baixa atividade de água (FELLER; GERDAY, 2003; D’AMICO et al., 2006).

Quanto ao aumento na fluidez da membrana de micro-organismos adaptados ao frio, parece estar relacionada a várias estratégias, sendo que a ocorrência mais frequente é o aumento na insaturação dos ácidos graxos, como observado em bactérias, arqueias, fungos e algas. Outras estratégias incluem mudanças na isomerização de ácidos graxos, aumento de ácidos graxos ramificados com grupos metila, bem como uma diminuição do comprimento médio na cadeia de ácidos graxos e na proporção de esterol/ fosfolípideo, além do aumento na concentração de pigmentos carotenóides não polares (SHIVAJI; PRAKASH, 2010, ROBINSON, 2001). A estrutura básica destes pigmentos é composta por uma cadeia longa com duplas ligações entre carbonos e simetria bilateral, a partir da qual são gerados diferentes compostos, especialmente com formação de anéis nas extremidades e pela adição de átomos de oxigênio, que fornece as características de cor e capacidade antioxidante. A presença de duplas ligações conjugadas favorece a isomerização da forma cis para a trans, sendo esta última a mais estável e a mais comum em plantas (RAO; RAO, 2007).

Por outro lado, micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes produzem enzimas ativas em baixas temperaturas, que exibem propriedades peculiares. No intuito de compensar a baixa energia cinética e inibição das reações químicas que ocorrem em ambientes gelados, estes organismos mantêm uma apropriada taxa reacional em processos vitais, por meio da síntese de enzimas com uma atividade 10 vezes maior que seus homólogos mesófilos. Isto é possível com o aumento na flexibilidade das estruturas das enzimas ativas em baixas temperaturas, o que as torna também mais termolábeis. Mudanças estruturais destas enzimas (principalmente no sítio ativo) incluem uma redução da hidrofobicidade, diminuição de interações iônicas e eletrostáticas e aumento da carga de resíduos de superfície para maior interação com o solvente, o que resulta em alta atividade específica em baixas temperaturas (CAVICCHIOLI et al., 2002; FELLER; GERDAY, 2003; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). A maior flexibilidade das enzimas adaptadas a baixas temperaturas é devido à menor quantidade de ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto nestas proteínas (Figura 3.2) em comparação aos homólogos de micro-organismos mesófilos (GOMES; STEINER, 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

Além da redução de ligações de hidrogênio e de pontes de dissulfeto, diminuição de interações iônicas e eletrostáticas e aumento da carga de resíduos de superfície, estudos cristalográficos de proteínas de psicrófilos, indicaram que as enzimas produzidas

por estes micro-organismos não possuem conformação muito diferente das enzimas homólogas de mesófilos e termófilos, porém contam com redução nos resíduos de prolina e arginina, bem como o agrupamento de resíduos de glicina (Figura 3.3). Estes arranjos, provavelmente determinam o caráter hidrofílico ou hidrofóbico do sítio ativo, permitindo maior flexibilidade e afinidade pelo substrato (SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

Figura 3.2 - Mecanismos de estabilização da estrutura da proteína, que podem sofrer alterações visando o aumento da flexibilidade.

Fonte: Gomes et al., 2007.

Figura 3.3 - Resíduos dos aminoácidos evidenciando as cadeias laterais (grupos R=): (A) prolina (grupo R polar não carregado), (B) arginina (grupo R polar carregado positivamente) e (C) glicina (grupo R não polar), que podem ser reduzidos (A e B) ou agrupados (C) em enzimas psicrófilas.

Fonte: Urdiales, 2005.

Na Tabela 3.1, estão apresentadas as estruturas e composições características de algumas enzimas adaptadas ao frio (deduzidas por raios X), de forma comparativa com seus homólogos mesófilos, evidenciando as modificações que ocorrem em enzimas de

psicrófilos e psicrotolerantes. Essas características especiais conferem a estas enzimas, grande potencial para utilização em processos biotecnológicos, pois além da economia de energia, proporcionam maiores rendimentos da reação, minimizam as reações químicas indesejáveis que podem ocorrer em maiores temperaturas e exibem termolabilidade para uma rápida inativação da enzima quando desejável (relevante para a indústria de alimentos) (CHAVICCHIOLI et al., 2002).

Tabela 3.1 - Comparação estrutural e composicional de elementos característicos de enzimas adaptadas ao frio com seus homólogos mesófilos, por meio de dedução por Raios-X. Códigos utilizados: **(+)**: presença da característica estrutural ou composicional; **(-)**: ausência da característica estrutural ou composicional; **0**: sem diferenças significativas entre enzimas adaptadas ao frio e seus homólogos termoestáveis; **X**: não examinado; Glu+Asp: Glutamato+Aspartato; Lis+Arg: Lisina+Arginina; Arg+Lis: Arginina +Lisina.

Enzima e organismo adaptado ao frio	Hidrofobicidade nuclear diminuída	Hidrofobicidade superficial aumentada	Menor carga residual total	Mais Histidina	Alta relação (Glu+Asp)/(Lis+Arg)	Menos pontes de Hidrogênio	Baixa relação Arg/Lis
Citrato sintase <i>Arthrobacter sp</i>	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
Metaloprotease <i>Pseudomonas sp</i>	(+)	0	0	(+)	0	0	(-)
Xilanase <i>Pseudoalteromonas sp</i>	X	(+)	(+)	X	(+)	0	(+)
Adenilato quinase <i>Bacillus globisporus</i>	(+)	(+)	0	(-)	(+)	(+)	(+)
Subtilisina <i>Vibrio sp.</i>	(+)	(-)	0	0	(+)	(-)	(-)
Celulase, módulo catalítico <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	X	(+)	(+)	X	(+)	(+)	(+)

Fonte: Adaptado de Siddiqui e Cavicchioli, 2006.

Como exemplo, podemos citar a purificação e caracterização de proteases extracelulares de oito linhagens de *Pseudomonas sp.*, com atividade ótima em 40°C e pH ótimo entre 7,0 e 9,0. Estas enzimas foram evidenciadas por pesquisadores da Universidade de Buenos Aires e do Instituto Antártico Argentino e podem ser utilizadas

em processos comerciais que requerem pH neutro e moderadas temperaturas, com especial interesse para sua aplicação em misturas de enzimas, onde uma inativação térmica é necessária (VAZQUEZ; CORIA; MAC CORMACK, 2004).

Com relação à termodinâmica, Siddiqui e Cavicchioli (2006) pontuaram que as enzimas adaptadas ao frio tendem a exibir uma maior constante catalítica (k_{cat}) quando comparadas aos seus homólogos mesófilos, devido à diminuição da barreira da energia livre de ativação ($\Delta G^\#$), que é composta pela entalpia de ativação ($\Delta H^\#$), entropia de ativação ($\Delta S^\#$) e temperatura absoluta (T) (**Equação (1)**). Segundo estes autores, de acordo com a teoria do estado de transição, k_{cat} está relacionada com a temperatura e parâmetros de ativação termodinâmica de acordo com a **Equação (2)**, na qual k_B é a constante de Boltzman ($1,38 \cdot 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,63 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) e R é a constante universal dos gases ($8314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$). Considerando esta teoria, verifica-se que a diminuição da energia livre de ativação ($\Delta G^\#$), com consequente aumento de k_{cat} , é possível com a diminuição na $\Delta H^\#$ e/ou aumento na $\Delta S^\#$ (SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T \cdot \Delta S^\# \quad (1)$$

$$K_{cat} = \left(k_B \cdot \frac{T}{h} \right) \cdot e^{\left(\frac{-\Delta G^\#}{R \cdot T} \right)} \quad (2)$$

Ainda de acordo com Siddiqui e Cavicchioli (2006), as mudanças estruturais observadas em enzimas adaptadas ao frio que resultam em maior flexibilidade destas, promovem a diminuição da entalpia ($\Delta H^\#$) de transição entre o estado fundamental e a formação do complexo enzima/substrato, devido ao menor número de interações a serem rompidas durante a formação do estado de transição. Como resultado da baixa $\Delta H^\#$, a taxa de reação tende a ser menos dependente da temperatura e altas taxas são mantidas, mesmo em baixas temperaturas (FELLER, 2003; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Porém, segundo estes autores, o aumento da taxa reacional das enzimas adaptadas ao frio pode ser justificado pela ocorrência simultânea da diminuição na $\Delta H^\#$ e aumento na $\Delta S^\#$, sendo que este último é provocado pelo deslocamento, pela ligação com o substrato,

de parte da camada organizada de água presente no sítio ativo, o que promove aumento na desordem do sistema.

A compreensão das relações entre a estabilidade térmica, flexibilidade e eficiência catalítica das enzimas de psicrófilos é de fundamental importância para a aplicação destas no setor biotecnológico e também para a realização de experimentos de mutagênese direcionada, complementada por evolução dirigida, buscando-se uma otimização da biocatálise por psicrófilos (GEORLETTE et al., 2004; D'AMICO et al., 2006).

Micro-organismos psicrófilos e psicrotolerantes exibem ainda outras estratégias que propiciam sua sobrevivência em ambientes gelados, como a produção de vários compostos para protegê-los do congelamento intracelular ou minimizar os efeitos deletérios da formação de cristais de gelo (MARGESIN et al., 2008; SHIVAJI; PRAKASH, 2010). Neste contexto, a trealose é apontada como um importante composto de estocagem em fungos e bactérias, em virtude de sua ação como um protetor geral contra o estresse do citosol, além de estabilizar a membrana durante processos de desidratação (GOODRICH et al., 1988; ROBINSON, 2001). Do mesmo modo outros solutos compatíveis como polióis (manitol, glicerol e sorbitol), açúcares (glicose, frutose) e aminoácidos (alanina e prolina), já foram relatados como crioprotetores em bactérias e fungos (ROBINSON, 2001; KAWAHARA, 2008; MARGESIN; MITEVA, 2011).

Além dos mecanismos já citados, estratégias de adaptação ao frio, podem incluir ainda a produção de proteínas anticongelantes, que modificam a estrutura dos cristais de gelo e inibem a formação de gelo por meio de 02 mecanismos: a) diminuem o ponto de congelamento da água, sem alterar o ponto de fusão, o que é conhecido como atividade de histerese térmica; b) no estado congelado, exibem atividade inibitória sobre a recristalização do gelo, favorecendo a formação de cristais menores em temperaturas abaixo de 0°C (GILBERT et al., 2004; KAWAHARA, 2008).

Robinson (2001), ao analisar os estudos de diversos autores sobre os mecanismos fúngicos de adaptação ao frio, concluiu que a maioria das enzimas de psicrófilos e psicrotolerantes tem uma temperatura ótima de catálise entre 40 e 60°C. Segundo este autor, estas temperaturas não são iguais e nem podem explicar a baixa temperatura ótima de crescimento de micro-organismos psicrófilos, que é em média 9-12°C, o que reforça a necessidade da atuação sinérgica de diferentes fatores para a adaptação ao frio polar.

3.3 Proteases: Propriedades e Aplicações

Enzimas proteolíticas têm sido tradicionalmente conhecidas por proteases, peptidases ou peptídeo-hidrolases e são enzimas hidrolíticas que catalisam a quebra de ligações peptídicas (Figura 3.4) em proteínas e em fragmentos de proteínas (BARRETT; RAWLINGS; O'BRIEN, 2001). Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC- IUBMB), as peptidases são enzimas que pertencem à classe 3 (hidrolases) e à subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases). Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99), de acordo com a posição da ligação a ser clivada na cadeia peptídica. Exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupo amino ou carboxi terminal do substrato, sendo classificadas como amino e carboxipeptidases, respectivamente, enquanto as endopeptidases clivam as ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica (VERMELHO et al., 2008).

Figura 3.4 - Esquema de uma reação de hidrólise da ligação peptídica em proteínas (—), catalisada por uma protease, onde: X^1 = cadeia peptídica ou bloqueador do N-terminal; X^2 = cadeia peptídica ou bloqueador do C-terminal; R_1 , R_2 = cadeias laterais.

Fonte: Machado et al., 2004.

A especificidade das proteases, entretanto, não está relacionada somente à posição da ligação peptídica, existindo também seletividade em relação à sequência de aminoácidos vizinhos à ligação, o que tem dificultado a classificação e nomenclatura destas enzimas. Segundo a classificação baseada na estrutura química do centro ativo

(Tabela 3.2), as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses, de acordo com os grupos químicos do centro ativo envolvidos no mecanismo catalítico. Neste sistema, as carboxipeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.16), metalo- (EC 3.4.17) e cisteína-carboxipeptidases (EC 3.4.18). As endopeptidases são subdivididas em serina- (EC 3.4.21), cisteína- (EC 3.4.22), aspártico- (EC 3.4.23), metalo- (EC 3.4.24) e treonina- endopeptidases (EC 3.4.25). Foi também identificado um sexto tipo catalítico, as glutâmico-peptidases, que apresentam o ácido glutâmico em seu centro ativo (VERMELHO et al., 2008).

Tabela 3.2 - Classificação de proteases de acordo com o sítio ativo. Os círculos abertos representam os resíduos de aminoácidos na cadeia polipeptídica e círculos fechados indicam os aminoácidos terminais. As estrelas indicam os grupos terminais bloqueados.

Protease	Modo de Ação	n°EC
Exopeptidases		
Amino peptidases	● ↓ ○ ○ ○ ○ ---	3.4.11
Dipeptidil peptidase	● ● ↓ ○ ○ ○ ---	3.4.14
Tripeptidil peptidase	● ● ● ↓ ○ ○ ---	3.4.14
Carboxipeptidases	--- ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ●	3.4.16 - 3.4.18
Serina protease		3.4.16
Metaloprotease		3.4.17
Cisteína protease		3.4.18
Peptidil dipeptidase	--- ○ ○ ○ ○ ○ ↓ ● ●	3.4.15
Dipeptidases	● ● ↓	3.4.13
Omega peptidases	* ● ↓ ○ ○ ---	3.4.19
	--- ○ ○ ○ ↓ ● *	3.4.19
Endopeptidases		3.4.21 - 3.4.34
Serina protease	--- ○ ○ ○ ○ ↓ ○ ○ ○ ---	3.4.21
Cisteína protease		3.4.22
Apártico protease		3.4.23
Metaloprotease		3.4.24
Endopeptidases de mecanismo catalítico desconhecido		3.4.99

Fonte: Rao et al., 1998.

As proteases podem ainda ser classificadas quanto ao pH de atuação, em ácidas (pH 2,0-6,0), neutras (pH 6,0-8,0) ou alcalinas (pH 8,0-13,0) (POLAINA; MACCABE, 2007). Particularmente quanto às proteases ácidas, normalmente designadas como proteases aspárticas ácidas ou aspartil proteases, são endopeptidases que dependem de resíduos de ácido aspártico para a sua atividade catalítica (Figura 3.5). A maioria delas mostra

atividade máxima em baixo pH (entre 2,0 e 5,0) e massa molecular em torno de 30-45 kDa (RAO et al., 1998). No caso das proteases alcalinas, estas são caracterizadas por sua alta atividade em pH alcalino (8,0 a 13,0) e sua grande especificidade pelo substrato, enquanto as proteases bacterianas neutras atuam em intervalo estreito de pH (5,0 a 8,0) e têm uma baixa termotolerância (RAO et al.,1998).

Figura 3.5 - Representação dos elementos estruturais de todas as peptidases aspárticas. A linha vermelha da fita leva ao domínio N-terminal, enquanto a linha azul leva ao domínio C-terminal. Cada elemento no domínio N-terminal é espelhado por um elemento semelhante no domínio C-terminal. (A) Vista frontal da estrutura do sítio ativo.(B) Vista da estrutura girada 90° (visão do fundo da molécula)

Fonte: Dunn, 2002.

As proteases estão amplamente distribuídas na natureza e as principais fontes destas enzimas são plantas, animais e micro-organismos. A produção destas enzimas a partir de plantas é um processo que requer tempo para o crescimento das mesmas, podendo ser influenciada por muitos fatores, como a disponibilidade de terras para o cultivo e adequadas condições climáticas (RAO et al., 1998). Dentre as proteases de

origem vegetal, as mais conhecidas são papaína, bromelina, queratinases e ficina, enquanto para as proteases produzidas por animais, destacam-se a tripsina, quimotripsina, pepsina e renina, cuja produção depende da disponibilidade de animais para o abate e de políticas públicas. Já no caso dos micro-organismos, a produção destas enzimas depende principalmente das exigências nutricionais e físicas do isolado em questão (RAO et al., 1998). Outro ponto importante destacado por Rao et al. (1998) e que merece atenção é que as peptidases microbianas passaram a ter grande relevância em virtude das deficiências na produção de proteases vegetais e animais e da alta demanda industrial. Ainda segundo Kumar e Takagi (1999) é importante ressaltar a facilidade de cultivo de micro-organismos em larga escala, para se alcançar altos rendimentos.

Quanto ao mercado de enzimas, este está dividido em dois grandes segmentos: enzimas industriais (enzimas técnicas, destinadas principalmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza, enzimas para a indústria de alimentos e bebidas e enzimas para ração animal) e enzimas especiais (enzimas terapêuticas, enzimas para diagnóstico, enzimas para química quiral e enzimas para pesquisa), onde a utilização industrial representa cerca de 60% do mercado global de enzimas (SÁ-PEREIRA et al., 2008).

O mercado global para enzimas industriais foi estimado em 3,3 bilhões de dólares em 2010 e a previsão é de que ultrapasse 4,4 bilhões de dólares em 2015 (BINOD et al., 2013). Com relação ao mercado externo brasileiro de enzimas, este foi estimado em 147,2 milhões de dólares no ano de 2005, o que corresponde a 3,7% do mercado internacional, sendo que as importações responderam por 86% e as exportações por 14%. Neste contexto, o Brasil é o país de maior destaque na América Latina, absorvendo 60% da demanda de enzimas, em que o valor das exportações de proteases e seus concentrados (em torno de 5,8 milhões de dólares), ultrapassaram o valor das importações destas enzimas no país (2,5 milhões de dólares) (BON et al., 2008).

O grupo das enzimas proteolíticas se destaca como um dos mais importantes e versáteis grupos de enzimas comerciais, respondendo por aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas industriais, com utilização em grande número dos processos biotecnológicos usados em muitas indústrias (EL ENSHASY et al., 2008). Deste percentual, 2/3 representam as proteases alcalinas, utilizadas principalmente em detergentes, que são ativas e estáveis em pH alcalino (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). Não há, na literatura recente, dados sobre a distribuição do mercado global por tipos de

enzimas comercializadas, entretanto em 1998, alguns autores publicaram uma análise comparativa (RAO et al., 1998), a qual pode ser observada na Figura 3.6.

Quanto às aplicações industriais, proteases microbianas são alvo de grande atenção, por serem em sua maioria extracelulares e propiciarem processos simplificados de recuperação, quando comparados às proteases vegetais e animais (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

Figura 3.6 - Distribuição do mercado mundial por tipos de enzimas. As porções com asterisco (*) representam o mercado de proteases.

Fonte: Adaptado de Rao et al., 1998.

As inúmeras aplicações das proteases destacadas abaixo são indicativas da importância destas enzimas no setor industrial:

a) na indústria de detergentes destacam-se as peptidases alcalinas produzidas por várias espécies de bactérias, principalmente as do gênero *Bacillus*, sendo a dinamarquesa Novozymes a mais bem estabelecida fabricante do mundo (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). A maioria dos detergentes é utilizada em temperaturas elevadas de lavagem, porém a identificação de enzimas que atuem em temperaturas baixas tem sido incentivada pelo aumento da utilização de fibras sintéticas, já existindo no mercado um produto denominado Kannase® (Novozymes), contendo uma peptidase eficiente na faixa de temperatura entre 10 e 20°C (MAURER, 2004).

b) na indústria de alimentos as proteases são particularmente utilizadas na fabricação de aromatizantes para sopas e molhos, para a obtenção de peptídeos antimicrobianos usados na redução de patógenos em alimentos (VERMELHO et al., 2008), na indústria de panificação, no preparo de carnes curadas, conservas e embutidos (COURI et al., 2008), como também na manufatura e redução do amargo de queijos e ainda na produção de extratos de levedura e de peptídeos bioativos que reduzem a alergenicidade de alimentos protéicos (NEGI; BANERJEE, 2009; YEGIN et al., 2011; AGYEI; DANQUAH, 2011; MERHEB-DINI et al., 2012).

c) na indústria farmacêutica proteases tem sido utilizadas em administração oral para corrigir certas síndromes de deficiências de enzimas líticas, bem como em combinação com antibióticos de largo espectro, para tratar queimaduras e feridas e também no tratamento de várias formas de leucemia linfocítica (RAO et al., 1998). Recentemente, vários estudos têm focado a produção de peptídeos bioativos (principalmente os derivados das proteínas do leite), com a utilização de proteases e peptidases específicas, com potencial para utilização como antimicrobianos em medicamentos e alimentos (AKALIN, 2014). Além disso, pesquisas envolvendo proteases de plantas e bactérias enfatizam as propriedades fibrinolíticas destas enzimas, que podem propiciar atividade anticoagulante, com potencial para utilização como trombolíticos (AGYEI; DANQUAH, 2011; BAJAJ; SHARMA; SINGH, 2013; MAJUMDAR et al., 2014; CHOI et al., 2014).

d) em química fina estas enzimas são empregadas na obtenção de aspartame, angiotensina, dinorfina e encefalina (KUMAR; BHALLA, 2005). Nestes casos podem ser utilizadas enzimas imobilizadas, o que aumenta a estabilidade enzimática e facilita a separação dos produtos de reação (VERMELHO et al., 2008).

e) no processamento de couro as proteases alcalinas microbianas são utilizadas para a remoção de pelos do couro animal ou para facilitar a embebição com água, como alternativa aos tratamentos químicos, conforme metodologias patenteadas por Belloc et al. (1981) e Shimizu, Sugiyama e Ohta (2005).

f) no tratamento de resíduos estas enzimas são utilizadas nas indústrias alimentícias como laticínios, processamento de carnes, extratos vegetais e processamento de sementes, convertendo rejeitos protéicos em biomassa utilizável (ANSELMO et al., 2008; CHI et al., 2009).

g) na produção de etanol, recentes pesquisas demonstram que a adição de proteases ácidas (aspárticas) ao meio de cultivo, pode aumentar a taxa de fermentação e o rendimento, diminuindo os custos envolvidos no processo (GUO et al., 2011; JOHNSTON; McALOON, 2014). De acordo com os autores citados, proteases ácidas podem promover a sacarificação do amido de milho, sem a necessidade de adição de amilases aos processos. Além disso, propõem que os aminoácidos produzidos podem acelerar a fermentação e resultar em aumento na produtividade de etanol.

h) na digestão de polissacarídeos e proteínas da parede celular de leveduras para a obtenção de proteínas intracelulares e pigmentos, além de obtenção de extrato de levedura e no tratamento de massa celular de levedura residual para ração animal (FLEURI; SATO, 2005).

i) outras aplicações das proteases estão como ferramentas de pesquisas para elucidar o relacionamento entre estrutura, função e síntese de peptídeos e seqüenciamento de proteínas (RAO et al., 1998).

j) Além das aplicações citadas acima, existem outras possibilidades nas áreas analítica, biotecnológica e terapêutica, a partir do uso da engenharia de proteínas, como por exemplo, a protease utilizada como ativador de plasminogênio tecidual, utilizada para dissolver trombos durante infarto do miocárdio (POGSON; GEORGIU; IVERSON, 2009).

Vários estudos foram feitos para se avaliar o papel das peptidases em sistemas biológicos complexos, como o catabolismo de proteínas, coagulação sanguínea, crescimento celular, produção de hormônios, transporte intermembranas, crescimento de tumores e metástases (RAO et al., 1998). Outras aplicações importantes destas enzimas podem ser citadas, como no preparo de protoplastos, transformação de leveduras para isolamento de produtos de recombinação de DNA e no estudo da composição e síntese da parede celular (FLEURI; SATO, 2005).

Diante deste cenário, como consequência da importância destas enzimas para a indústria, segundo Cherry e Fidantsef (2003), o crescimento do mercado de proteases depende da identificação e caracterização de novas enzimas de fontes naturais, bem como da modificação das mesmas para melhorar o desempenho em determinadas aplicações e aumentar o nível de expressão. Além disso, é relevante levar em consideração que para um eficiente processo de obtenção de enzimas pela indústria, é de

fundamental importância conhecer os vários parâmetros de fermentação, técnicas de purificação e propriedades das mesmas (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002).

3.4 Produção de proteases por micro-organismos

Segundo Kumar e Takagi (1999), os micro-organismos representam uma excelente fonte de enzimas, pois além de sua ampla diversidade bioquímica, são facilmente cultiváveis em larga escala, susceptíveis à manipulação genética e proporcionam altos rendimentos. Além disso, de acordo com Gupta et al. (2002), proteases microbianas apresentam ainda o diferencial de serem, em geral, extracelulares e diretamente secretadas no meio de fermentação, o que facilita os processos de recuperação.

Na Tabela 3.3 se encontram diferentes micro-organismos produtores de proteases em condições definidas de temperatura e pH, cuja produção máxima da enzima pode variar, sob a influência de diversos fatores, tais como a disponibilidade de nutrientes, temperatura, pH e aeração do meio de cultivo (RAY et al, 1992; TURKIEWICZ et al., 2003; EL ENSHASY et al., 2008; CHI et al., 2009).

Especificamente quanto à produção de proteases por fungos, em sua maioria são proteases ácidas, que compõem o grupo de maior interesse para a indústria de alimentos e farmacêutica (MUKHTAR; HAQ, 2009), podendo ser amplamente dividida em dois grupos: (i) enzimas semelhantes à pepsina, produzidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Neurospora* e *Rhizopus* e (ii) enzimas semelhantes à renina, produzidas por *Endothia* e *Mucor* (RAO et al., 1998; MUKHTAR; HAQ, 2009). Porém, novos gêneros têm sido explorados quanto à produção de proteases ácidas por muitos cientistas, embora estes relatem uma atividade enzimática ainda baixa (RAY et al., 1992; BOSSI; BONIZZATO; ZAPPAROLI, 2006; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2013; GOGLIETTINO et al., 2014).

Entretanto, embora a produção da maioria das proteases ácidas seja por fungos filamentosos, há uma grande dificuldade em correlacionar os trabalhos disponíveis na literatura envolvendo a atividade proteolítica de diferentes linhagens destes micro-organismos, em virtude dos diferentes métodos e análises empregadas (BOSSI; BONIZZATO; ZAPPAROLI, 2006; MUKHTAR, HAQ, 2009; NEGI; BANERJEE, 2009; YIN et al., 2013; GOGLIETTINO et al., 2014). No caso das leveduras, embora a secreção de enzimas proteolíticas não seja uma propriedade comum, a maioria delas produz aspartil proteases

ácidas e algumas poucas espécies produzem serina peptidases e proteases neutras ou alcalinas (CHAROENCHAI et al., 1997; TURKIEWICZ et al., 2003; VAZQUEZ; RUBERTO; MAC CORMACK, 2005; CHI et al., 2009).

Tabela 3.3 - Exemplos de micro-organismos produtores de proteases em que a produção máxima ocorreu em diferentes parâmetros físico-químicos (temperatura e pH) de cultivo.

Micro-organismo	T (°C)	pH	Referência
<i>Pseudomonas fragi</i>	7	6,5	Kohlmann et al.,1991
<i>Candida humicola</i>	4	4	Ray et al., 1992
<i>Verticillium cfr. Lecanii</i>	20	*	Fenice et al., 1997
<i>Candida pulcherrima</i>	25	*	Charoenchai et al., 1997
<i>Streptomyces cyaneus</i>	28	9 a 10	Petinate et al, 1999
<i>Leucosporidium antarcticum</i>	5	4,0-5,0	Turkiewicz et al., 2003
<i>Clostridium</i> sp.	10	8	Alam et al.,2005
<i>Bacillus</i> sp	*	7,0-9,0	Patel; Dodia; Singh, 2005
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	24	8	Vazquez;Ruberto; Mac Cormack, 2005
Fungo marinho	30	9	Damare et al., 2006
<i>Bacillus licheniformis</i>	37	7,6	El Enshasy et al., 2008
<i>Colwellia</i> sp.	7,96	*	Wang et al., 2008
<i>Bacillus thuringiensis</i>	30	7	Infante et al., 2009
<i>Aureobasidium pullulans</i>	24,5	6	Chi et al., 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	27	3,2	Vishwanatha; Rao; Singh, 2009
<i>Aspergillus oryzae</i>	25	6	Kumura et al.,2011
<i>Bacillus</i> sp	43	5,1	Queiroga et al., 2012

* =Dados não apresentados pelo autor.

Quanto aos meios de cultivo para avaliação dos fungos produtores de proteases, a literatura apresenta diversos estudos que empregam meios constituídos de glicose como fonte de carbono, suplementados com peptona de carne e caseína como fontes de nitrogênio, como o meio Sabouraud (SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; SANTIAGO; MOTA, 2008). Entretanto, um grande número de pesquisas tem se concentrado na avaliação de meios de cultivo de fontes diversificadas de carbono (sacarose, amido, glicose) e nitrogênio (peptona, extrato de levedura, nitrato de sódio, sulfato de amônio), além de resíduos agro-industriais (farelo de soja, farelo de arroz, farelo de trigo) (DEEGENAARS; WATSON, 1997; TURKIEWICZ et al., 2003; DAMARE et al., 2006; CHI et al., 2007; ABID; LIMAN; NEJIB, 2008; MUKHTAR; HAQ, 2009; INFANTE et al., 2009).

Com relação à fonte de nitrogênio Gupta et al (2002) afirmaram que a relação C/N (carbono/nitrogênio) no meio de cultivo regula a produção de proteases e que o aumento desta razão pode ser feito através da utilização de alimentação contínua, permitindo prolongar a fase estacionária da cultura, na qual a maioria das proteases extracelulares é produzida. Estudos realizados por Al-Sheri e Mostafa (2004), revelaram que a produção de proteases em meios contendo nitrogênio orgânico foi mais eficiente que em meios contendo nitrogênio inorgânico. De fato, Patel, Dodia e Shing (2005) constataram a indução de proteases extracelulares pela presença de nitrogênio orgânico, caseína e casaminoácidos. Porém, encontraram fenômenos de repressão do crescimento e produção enzimática quando a fonte de nitrogênio utilizada foi inorgânica (cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de amônio).

Gupta e Khare (2007) pontuam ainda que com relação às condições de cultivo para a produção de proteases, cada espécie micro-organismo ou ainda cada linhagem, tem seus próprios requerimentos especiais para a máxima produção enzimática. Estes autores observaram que fontes complexas de nitrogênio favoreceram tanto a produção de proteases para uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* tolerante a solventes, quanto o crescimento desta bactéria. Além disso, estes pesquisadores verificaram ainda que a maior produção destas enzimas ocorreu com a utilização de caseína e extrato de levedura, sendo que a utilização de triptona e peptona promoveram uma redução de cerca de 50% na atividade de proteases e a utilização de nitrogênio inorgânico resultou em baixíssima produção destas enzimas. Este favorecimento também foi observado para

B. licheniformis quando utilizado farelo de soja como fonte complexa de nitrogênio (EL ENSHASY et al., 2008).

No caso de *Pichia anomala* e *Candida pulcherrima*, pesquisadores observaram aumento na produção de proteases extracelulares em meios carentes de aminoácidos e sulfato de amônio, o que sugere que a produção destas enzimas por leveduras é reprimida por fontes de nitrogênio prontamente disponíveis (CHAROENCHAI et al., 1997). Também segundo Ray et al. (1992), a atividade proteolítica de *Candida humicola* foi drasticamente reduzida pela presença de aminoácidos e sulfato de amônio, porém aumentada quando BSA (Bovine Serum Albumin) foi ofertada como única fonte de nitrogênio, o que reforça o efeito de indução destas enzimas em presença de proteínas complexas.

Já para o fungo filamentoso *Botrytis cinerea*, pesquisas realizadas por Abidi, Liman e Nejib (2008) demonstraram que uma mistura de triptona e extrato de levedura foi uma boa fonte de nitrogênio para a produção destas enzimas, enquanto a utilização de uréia provocou expressiva diminuição no crescimento e paralizou a produção de proteases por este micro-organismo. Ainda nestas pesquisas, foram selecionados os melhores substratos indutores para a produção de proteases, sendo a máxima atividade de protease (1879UP/ml) encontrada com a adição da alga marinha *Spirulina* ao meio de cultivo. Por outro lado, Chi et al. (2007) constataram que a utilização de nitrato de sódio como fonte de nitrogênio estimulou a produção de proteases, e outras fontes, inclusive as complexas (peptona, caseína e triptona), diminuíram muito a produção destas enzimas pela levedura marinha *Aureobasidium pullulans*.

É importante salientar que fonte de nitrogênio alternativa às convencionalmente empregadas na formulação de meios de cultivo microbianos pode ser suprida pela utilização de resíduos agro-industriais. Pesquisas realizadas por Muktar e Haq (2009), evidenciaram o favorecimento da produção de proteases ácidas com a utilização de farelo de girassol como componente do meio de cultivo de *Aspergillus niger* IHG9. Do mesmo modo, Vishwanatha, Rao e Singh (2009) utilizaram meio de cultivo suplementado com farelo de trigo e farelo de soja, para a produção de protease ácida por *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. Também no caso da bactéria *Bacillus licheniformis*, o farelo de soja (rico em nitrogênio orgânico e inorgânico), favoreceu a produção de protease extracelular alcalina (EL ENSHASY et al., 2008).

O farelo de arroz, o qual é composto por 15,33% de proteína bruta, além dos íons cálcio, fósforo, cobre, ferro, manganês, zinco e outros nutrientes (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009) tem despertado grande interesse nas pesquisas biotecnológicas quanto ao seu aproveitamento como suplemento na composição nutricional de meios de cultivo. O elevado valor nutritivo do farelo de arroz (Tabela 3.4) aliado à sua relativa disponibilidade e baixo custo, estimula a sua utilização na composição de meios de cultivo para a produção de produtos com alto valor agregado, como no caso da produção de xilitol (FELIPE, 2004). O emprego deste farelo como suplemento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar favoreceu o metabolismo da levedura *Candida guilliermondii* durante pesquisas para a produção de xilitol (RODRIGUES, 2005) e também a utilização deste farelo como nutriente na formulação de meio para a produção de etanol foi ainda relatada durante pesquisas com o mesmo hidrolisado, empregando-se a levedura *Pichia stipitis* (SILVA et al., 2011).

Além da fonte de nitrogênio, a influência da fonte de carbono também foi avaliada nas pesquisas sobre a produção de proteases, tanto de forma qualitativa quanto quantitativa (PATEL; DODIA; SINGH, 2005; GUPTA; KHARE, 2007; EL HADJ-ALI et al., 2007; EL ENSHASY et al., 2008; ABID; LIMAN; NEJIB, 2008). Em alguns destes estudos, particular importância tem sido dada à redução na produção de proteases devido à repressão exercida pela glicose (KUMAR; TAKAGI, 1999; PATEL; DODIA; SINGH, 2005). De acordo com Patel, Dodia e Singh (2005), foi constatada repressão na produção de proteases de *Bacillus* sp, com diminuição da atividade enzimática de $120\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$ para $4\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$, quando a concentração de glicose no meio de cultivo foi aumentada de 0,2 para 2% (p/v). Resultado semelhante foi encontrado por Gupta e Khare (2007), em pesquisas com diferentes fontes de carbono para a produção de proteases por *Pseudomonas aeruginosa*. Segundo estes autores, o efeito de repressão pela glicose, promoveu uma diminuição de aproximadamente 50% na atividade proteolítica, com relação às demais fontes utilizadas. Neste caso, a carboxi metil celulose foi a fonte utilizada com maior eficiência, seguida por glicerol, sacarose, maltose e frutose.

No caso do fungo filamentoso *B. cinerea*, o aumento na concentração de glicose (de 0,5 para 2%) também promoveu a diminuição da produção de proteases alcalinas em cerca de 30-50% (ABID; LIMAN; NEJIB, 2008). De acordo com estes mesmos autores, a adição de amido aumentou 1,6 vezes a produção de proteases, enquanto a utilização de

melaço favoreceu a produção destas enzimas, sendo esta 2,4 vezes superior àquela produzida no meio contendo glicose. Por outro lado, no caso da cepa industrial de *B. licheniformis*, foi verificado que a maior atividade enzimática de proteases (2450U/ml), ocorreu com a concentração de 60g/L de glicose no meio de cultivo (EL ENSHASY et al., 2008).

Tabela 3.4 - Composição química de alguns subprodutos do beneficiamento do arroz.

	Quirera de arroz fina	Quirera de arroz média	Quirera de arroz grossa	Farelo de arroz integral	Farelo de arroz desengord.
Matéria seca (%)	86,68	86,2	86,32	87,24	90,68
Proteína (%)	7,71	8,04	8,72	11,54	15,33
Fibras (%)	0,48	0,42	0,61	10,98	9,82
Cinzas (%)	0,43	0,43	0,53	8,96	10,43
Cálcio (%)	0,01	0,01	0,01	0,03	0,11
Fósforo (%)	0,21	0,15	0,12	1,87	1,93
Cobre (mg/Kg)	1,71	1,63	2,24	4,19	20,18
Ferro (mg/Kg)	9,73	8,51	15,65	82,65	286,87
Manganês (mg/Kg)	9,31	7,95	8,58	103,46	ND
Zinco (mg/Kg)	16,18	15,67	17,05	53,89	73,74

ND= não determinado

Fonte: Adaptado de Chaud, Arruda e Felipe, 2009.

Outras fontes de carbono também foram avaliadas durante a produção de proteases, como sacarose, amido, maltose, lactose, soro de leite, caseína, entre outros. De acordo com Silva, Delatorre e Martins (2007), a presença de amido, maltose e soro de leite no meio de cultivo de *Bacillus* sp. termófilos, resultaram em maior secreção de proteases, sendo que na concentração de até 1% de maltose o crescimento bacteriano e a atividade enzimática foram favorecidos, enquanto lactose e sacarose não foram efetivas para a produção destas enzimas. Do mesmo modo, a utilização de lactose promoveu redução do crescimento e síntese de proteases quando utilizada na composição de meio de cultivo de *B. licheniformis* NH1, enquanto caseína proporcionou maior atividade de

proteases alcalinas, encontrando-se máxima atividade (2807U/ml) quando utilizado 5g/L deste nutriente como fonte de carbono (EL HADJ-ALI et al., 2007).

Ainda com relação à composição do meio de cultivo, Manachini e Fortina (1998), isolaram uma variedade de *B. licheniformis* halotolerante de sedimentos marinhos, com capacidade para produzir proteases com alta atividade durante a breve fase estacionária de crescimento. Estes autores utilizaram água do mar no meio de fermentação e verificaram aumento da atividade enzimática em 150% em relação à utilização de água destilada, mostrando particularidades em variedades específicas da bactéria.

Segundo Patel, Dodia e Singh (2005), máximo crescimento e produção de proteases (410U/ml) por *Bacillus* sp. haloalcalifílica foi observado em concentração de 10% de sal (NaCl), enquanto na ausência deste, a produção enzimática foi suprimida. Entretanto, Patel et al.(2006), em pesquisas com a mesma bactéria, observaram que concentração salina acima de 0,2% (p/v), levou à redução na atividade enzimática, sendo este efeito adverso mais pronunciado em preparações purificadas, em comparação com o extrato cru.

Além da concentração salina, o efeito de alguns íons metálicos sobre a produção de proteases também foi estudado (EL HADJ ALI et al., 2007; ABID; LIMAN; NEJIB, 2008). El Hadj Ali et al. (2007), em pesquisas com *B. licheniformis*, testaram alguns aditivos ao meio de cultivo e verificaram que apenas KCl ($1,5\text{g.L}^{-1}$) estimulou a produção enzimática, verificando um aumento de 1,3 vezes em relação àquela encontrada no meio sem KCl. Estes autores avaliaram também o efeito de cátions divalentes no meio de cultivo e constataram que CaCl_2 promoveu leve aumento na atividade de proteases, enquanto a atividade foi reduzida na presença de Mn^{2+} . Resultados semelhantes foram encontrados por Abid, Liman e Nejib (2008) em pesquisas com o fungo *B. cinerea*. Nestas pesquisas foi constatado aumento de 153% na atividade de protease alcalina com a adição de 1g.L^{-1} de KCl ao meio de cultivo. Estes autores, avaliaram também o efeito da presença de íons metálicos e cátions divalentes (CaCl_2 , CoCl_2 , MnSO_4 , CuCl_2 , ZnSO_4 , FeSO_4 , HgCl_2 e KCl) sobre a produção de protease alcalina por *B. cinerea*, e constataram que a adição de 0,03% de CaCl_2 e FeSO_4 ao meio de cultivo, resultou em aumento na produção de proteases, o que levou os autores à conclusão de que Ca^{2+} e Fe^{2+} foram necessários para a indução enzimática e/ou estabilização.

Além dos estudos sobre a influência dos fatores nutricionais na produção de proteases por micro-organismos, vários pesquisadores direcionaram suas pesquisas para o estudo de parâmetros físico-químicos como temperatura, pH, agitação e necessidade de O₂ (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002). De acordo com Kumar e Takagi (1999), a temperatura é um parâmetro crítico na produção de proteases alcalinas, que pode variar muito, de acordo com micro-organismo ou a cepa em questão. Damare et al. (2006), observaram maior crescimento e produção de proteases a 30°C, em pesquisas com linhagens de fungos isoladas em alto mar (particularmente *Aspergillus ustus* NIOCC 20), enquanto para *Aspergillus oryzae* esta foi ótima a 25°C (KUMURA; ISHIDO; SHIMAZAKI, 2011). Temperaturas mais baixas (10°C) foram apropriadas para a produção destas enzimas por *Clostridium* sp. psicotolerante, isolado na Antártica (ALAM et al., 2005).

Para o caso de isolados da Antártica, segundo Gerday et al. (2000), estes são comumente cultivados a 5°C em laboratório, o que permite perfeito funcionamento de seu metabolismo e assegura a ausência de estresse celular. Estes autores relatam ainda, que no caso da bactéria psicrófila *Pseudomonas* sp. (originária da Antártica), temperaturas mais elevadas (> 20°C), apesar de reduzirem o tempo de geração, levaram à baixa produção de proteases, o que também ocorreu em estudos com a levedura da Antártica *Leucosporidium antarcticum* 171 (TURKIEWICZ et al., 2003). Turkiewicz et al. (2003) observaram que a produção das proteases por *Leucosporidium antarcticum* foi dependente da temperatura, sendo máxima entre 5-6°C, 10°C abaixo da temperatura ótima de crescimento (15°C). Além disso, a atividade proteolítica foi 50% maior a 5-6°C que a 15°C. Do mesmo modo, Ray et al. (1992), observaram que a produção de protease extracelular por *C. humicola* coletada na Antártica foi máxima quando esta levedura foi cultivada em temperaturas mais baixas (4 e 15°C) em pH 4,0, enquanto a temperatura ótima para o crescimento desta levedura foi de 22°C.

Por outro lado, Wang et al. (2008) constataram que há uma relação entre a temperatura e a fonte de carbono, ao pesquisarem a otimização da produção de proteases pela bactéria psicrófila *Colwellia* sp. NJ341 (WANG et al., 2008). Estes autores encontraram que a temperatura foi o fator de maior impacto sobre a produção desta enzima, sendo que esta bactéria poderia sintetizar mais proteases a baixas temperaturas (8-12°C), na presença de caseína (5g/L).

Assim como a temperatura, a variação do pH também tem grande interferência no crescimento microbiano, produção e atividade de proteases. Segundo Ferrero *et al.* (1996), pH acima de 9,0 favoreceu o crescimento e a produção de proteases alcalinas pela bactéria *B. licheniformis* MIR 29, o que também foi observado por Patel, Dodia e Singh (2005) em pesquisas com a bactéria *Bacillus* sp. Resultados semelhantes foram encontrados por Manachini e Fortina (1998) em pesquisas com *B. licheniformis*, porém halotolerante, isolada de sedimentos marinhos. Por outro lado, estes mesmos autores verificaram que valores inferiores de pH favoreceram o consumo de glicose (pH= 7,5), a produção de proteases na fase estacionária de crescimento (pH= 7,25) e a produção de biomassa (pH= 7,0) por um isolado de *B. licheniformis* não halotolerante. Segundo estes autores, este comportamento indica que o pH ótimo para a produção de proteases por esta bactéria está entre 7,0 e 7,25, já que a máxima concentração de biomassa leva a um aumento na produção enzimática da fase estacionária.

Outro parâmetro que deve ser levado em consideração para o favorecimento da produção de proteases é o controle da aeração do meio de cultivo. Segundo Pastor, Lorda e Balatti (2001), a taxa de aeração de 1 vvm a 750 rpm em reator agitado, favoreceu a produção de proteases por *Bacillus subtilis* 3411, a qual não foi favorecida quando a agitação foi aumentada para 1000 rpm. Estes autores sugerem que a alta taxa agitação possa causar alterações na estrutura da enzima, diminuindo a atividade proteolítica. Já para *B. licheniformis*, o aumento da taxa de aeração (0,5 a 2,0 vvm) em reator agitado gerou uma significativa diminuição na taxa de crescimento e massa total de células, enquanto para a produção de protease alcalina, a baixa taxa de aeração (0,5 vvm) teve um efeito mais negativo que a alta taxa de aeração (2,0 vvm), observando-se maior produção desta enzima com a taxa de aeração de 1 vvm ($49 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (EL ENSHASY et al., 2008). Segundo estes autores a diminuição da taxa de crescimento observada, ocorreu pelo aumento da tensão de cisalhamento, bem como do stress oxidativo sobre as células.

Vários autores têm discutido ainda a relação entre a produção de proteases e a fase de crescimento dos micro-organismos, verificando-se, na maioria dos trabalhos em que esta correlação foi abordada, que a maior produção de proteases ocorre na fase estacionária de crescimento (RAY et al., 1992; MANACHINI; FORTINA, 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; GUPTA; KHARE; 2007; ABIDI; LIMAM; NEJIB, 2008). Segundo Gupta et al (2002) a produção de proteases é regulada

pela limitação de nutrientes do meio e também produção de biomassa durante a fase de crescimento exponencial (GUPTA et al., 2002).

Ainda com o intuito de favorecer a produção e atividade de proteases, outras estratégias podem ser utilizadas, como pesquisas envolvendo a manipulação genética, que podem levar à obtenção de eficiência catalítica aumentada e melhora da estabilidade destas enzimas com relação à temperatura e pH (GUPTA; BEQ; LORENZ, 2002; GUO et al., 2011).

A escassez de pesquisas sobre a produção de proteases extracelulares por leveduras já foi citada por Ogrydziak (1993), visto que poucas espécies foram consideradas fortemente proteolíticas em função do rendimento e mesmo após 20 anos continuam escassos os trabalhos a esse respeito. Neste contexto, observa-se maior avanço nos últimos anos, considerando que a maioria dos trabalhos tem focado leveduras marinhas (CHI et al., 2007; CHI et al., 2009) e a exploração da biodiversidade de leveduras de ambientes gelados (TURKIEWICZ et al., 2003; VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013; SINGH et al., 2014).

3.5 *Rhodotorula mucilaginosa*

O gênero *Rhodotorula* pertence ao reino Fungi, sendo classificado como basidiomiceto da família *Cryptococcaceae*, cuja produção característica do carotenóide torularodina (pigmento que dá às colônias a coloração rosada), tem estimulado as pesquisas na área biotecnológica (FUNG et al., 2009). Este gênero foi previamente considerado como não patogênico, porém nas últimas décadas, estudos revelaram algumas espécies como patógenos oportunistas em pacientes imunocomprometidos e idosos (LUNARDI et al., 2006; TUON; COSTA, 2008; FUNG et al., 2009; WIRTH; GOLDANI, 2012).

De acordo com estudo de revisão da literatura realizado por Tuon e Costa (2008), o fator de risco mais comum associado à fungemia por *Rhodotorula* foi o uso de cateter venoso central, sendo os casos atribuídos principalmente a *R. mucilaginosa* (74%) e *R. glutinis* (17%). Entretanto, este fungo foi também relacionado com infecções cutâneas (onicomicose) em pacientes imunocompetentes e, recentemente, foi relatado um caso de meningite e endocardite infecciosa em paciente sem comprometimento imunológico

(2011). No caso de onicomicose, o estudo de outras espécies de leveduras, principalmente do gênero *Candida* revelou que a patogenicidade está associada com a secreção de proteases aspárticas, sendo este considerado um fator de virulência (KORTING; SCHALLER, 2001). De fato, segundo Ogrydziak (1993), as proteases desempenham papel chave para a patogênese de leveduras em humanos, principalmente nas infecções relacionadas ao gênero *Candida*.

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 por exemplo, o gênero *Rhodotorula* (OGRYDZIAK, 1993). Dentre os relatos de produção de proteases por leveduras, podemos citar as espécies *C. humicola* (RAY et al., 1992), *C. pulcherrima* (CHAROENCHAI et al., 1997), *L. antarcticum* (TURKIEWICZ et al., 2003), *A. pullulans* (CHI et al., 2007) e *Cryptococcus* sp. (RAO et al., 2011).

Quanto à produção de proteases por *Rhodotorula*, estudo datado de fevereiro de 1974, revelou a produção de uma protease ácida aspártica por *Rhodotorula glutinis* (LIU; HATANO, 1974) e recentes estudos abordando a diversidade fúngica da Antártica, reportaram a seleção deste gênero como potencial produtor de enzimas proteolíticas (VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013). Também uma nova espécie deste gênero, *Rhodotorula svalbardensis*, isolada no Ártico, foi recentemente estudada quanto à produção de proteases, exibindo boa atividade enzimática a 4°C (SINGH et al., 2014).

A levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (ou *Rhodotorula rubra*) tem ampla distribuição em ambientes terrestres, aquáticos e marinhos, sendo encontrada também em ambientes extremos (LIBKIND et al., 2008; VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013). Esta espécie é comumente associada à produção de carotenóides, os quais são responsáveis pela atividade pró vitamina A e propriedades antioxidantes (MOORE et al., 1989; AKSU; EREN, 2005; MALDONADE; SCAMPARINI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2007; MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012), porém, não foram encontrados relatos na literatura quanto à produção de proteases extracelulares por esta levedura.

Com relação à produção de carotenóides por *R. mucilaginosa*, pesquisas realizadas por Maldonade, Rodriguez-Amaya e Scamparini (2012), demonstraram que o pH inicial teve pouca influência sobre a produção destes compostos e que a fonte de nitrogênio (extrato de levedura), foi a variável mais importante para o aumento na concentração dos

mesmos, sendo máxima ($152 \mu\text{g.g}^{-1}$) com 5 g.L^{-1} de extrato de levedura e 10 g.L^{-1} de glicose. Estes autores também encontraram que a produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* não tem uma correlação direta com o crescimento desta levedura, prevalecendo a produção em dois estágios. Akzu e Eren (2005), também avaliaram a influência de diferentes variáveis sobre a produção de carotenoides por *R. mucilaginosa* e verificaram que o melhor pH e temperatura neste caso foram 7,0 e 30°C , respectivamente. Neste estudo foram utilizadas diferentes fontes de carbono, como melaço, glicose e lactose do soro de leite, sendo esta última apontada como a melhor fonte para o rendimento do produto (35 mg. g^{-1} de células).

Além da produção de carotenoides por *R. mucilaginosa*, estudos recentes apontam para a exploração de diferentes aplicações biotecnológicas desta levedura. Segundo Vajzovic et al. (2012), *R. mucilaginosa* PTD3 isolada de caules de álamo híbrido foi capaz de produzir xilitol de xilose e etanol de glicose, galactose e manose com bons rendimentos (67, 84, 86 e 94% do rendimento teórico, respectivamente). Estes autores também demonstraram a habilidade desta levedura em fermentar o hidrolisado lignocelulósico de álamo híbrido pré-tratado, com bom rendimento em xilitol (dados não apresentados). Por outro lado, Jarboui et al. (2013), encontraram que o isolado de *R. mucilaginosa* CH4 apresentou propriedades de remoção de compostos polifenólicos de águas residuais da produção de azeite, quando utilizada para o tratamento deste efluente, resultando em clareamento e purificação. Estudos realizados com esta espécie evidenciaram também a produção de uma glicoproteína biossurfactante, com habilidade para estabilizar a astaxantina, um carotenóide natural utilizado como suplemento alimentar, que apresenta estabilidade deficiente, devido ao seu potencial para oxidação (KAWAHARA et al., 2013).

3.6 Caracterização parcial de proteases de micro-organismos: estabilidade e condições ótimas para a atividade proteolítica

Tão importante quanto estabelecer condições adequadas para favorecer a produção de proteases extracelulares por micro-organismos, a caracterização destas enzimas pode revelar propriedades que permitem sua utilização em uma ampla diversidade de processos biotecnológicos. Vários pesquisadores já reportaram que as

condições físico-químicas (temperatura e pH) de cultivo que levam à máxima produção de proteases extracelulares, não coincidem com as condições ótimas requeridas para a máxima atividade das mesmas (RAY et al., 1992; TURKIEWICZ et al., 2003; CHI et al., 2007; NEGI; BANERJEE, 2009; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2013).

Chi et al. (2007), observaram que a protease alcalina produzida pela levedura marinha *A. pullulans* em pH 6,0 a 24,5°C, exibiu máxima atividade a 45°C em pH 9,0 (447,5U.mg⁻¹ de proteína). De modo coincidente, pesquisas com o fungo *Aspergillus awamori* revelaram a produção de uma protease ácida a 37°C, que apresentou máxima atividade em 55°C e pH 5,0 (~100 U.ml⁻¹), sendo que a estabilidade desta enzima foi de 150, 120, 65 e 15 minutos a 40, 50, 60 e 70°C, respectivamente (NEGI; BANERJEE, 2009). Da mesma forma, Vishwanatha, Rao e Singh (2009), em pesquisas com o fungo *Aspergillus oryzae* em cultivos a 27°C, purificaram e caracterizaram uma protease ácida com máxima atividade em 55°C e pH 3,2 (8,3 U.g⁻¹ de farelo de trigo seco). Segundo estes autores, esta enzima permaneceu estável em pH 2,5-6,0 a 30°C por 24 horas e a temperaturas entre 40 e 57°C.

A purificação e caracterização de uma nova protease aspártica produzida pela levedura *Cryptococcus* sp. S-2, revelou que esta enzima foi estável até 50°C em pH 3,0-7,0 após incubação por 60 minutos, com máxima atividade a 30°C em pH 5,0, embora esta levedura tenha sido cultivada em meio YMB (extrato de levedura, extrato de malte, peptona e glicose) a 25°C (RAO et al., 2011). Também uma protease aspártica ácida produzida pelo fungo *Aspergillus niger* BCRC 32720 (cultivado a 30°C), teve sua máxima atividade a 50°C em pH 2,5 (370 U.ml⁻¹). Os ensaios para verificar a estabilidade desta enzima foram realizados pela incubação da mesma por 30 minutos em diferentes valores de pH e temperatura, resultando em manutenção da atividade enzimática em pH 2,0-4,0 e temperatura abaixo de 40°C, com perda total da atividade em 60°C (YIN et al., 2013).

Especificamente no caso de isolados da Antártica, segundo Ray et al. (1992), é possível que a maior atividade proteolítica da enzima produzida em menores temperaturas seja a chave para a máxima utilização de substratos proteicos no solo do ambiente Antártico, o que foi também compartilhado por outros autores (FELLER; GERDAY, 2003; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). Ray et al. (1992) observaram que a protease ácida produzida pela levedura *Candida humicola* isolada na Antártica, exibiu ótima atividade a 37°C (22U), sendo que o pH ótimo para a atividade proteolítica foi entre

1,0 e 1,2. Quanto à estabilidade desta enzima, a mesma reteve 100% da atividade quando exposta por 2 horas a 15, 22 ou 37°C e foi totalmente inativada quando incubada por 10 minutos a 56°C. Já a produção desta enzima foi maior em baixas temperaturas (4 e 15°C) e pH 4,0.

Do mesmo modo, pesquisas realizadas por Vazquez, Ruberto e Mac Cormack (2005), com três linhagens psicrotolerantes de *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas no solo da Antártica, revelaram que enquanto a maior secreção de enzimas proteolíticas ocorreu a 20°C, a enzima purificada apresentou máxima atividade em 55-60°C. A estabilidade térmica desta enzima foi menor que a produzida por seu homólogo mesófilo, apresentando atividade residual de 74-79% após 90 minutos de incubação a 40°C. Assim, segundo estes autores, isolados psicrotolerantes da Antártica podem ser adaptados ao frio no sentido de sintetizar enzimas com maior atividade, porém as proteases que produzem se assemelham mais a enzimas mesofílicas.

Com efeito, também uma protease alcalina produzida pelo fungo marinho *Aspergillus ustus* tolerante ao frio, apresentou maior atividade enzimática em 45°C, enquanto o pH ótimo foi 9,0 (1639 ACU.ml⁻¹), após cultivo a 30°C. Neste caso, a enzima purificada apresentou atividade residual de 80 e 55% a 50 e 60°C, respectivamente, após 10 minutos de incubação (DAMARE et al., 2006).

Entretanto, Turkiewicz et al. (2003) verificaram que, embora haja uma diferença significativa entre os parâmetros físico-químicos utilizados para a secreção de proteases e a atividade proteolítica da enzima purificada, no caso de micro-organismos psicrófilos obrigatórios, a temperatura ótima para a atividade é bem mais baixa que no caso dos psicrotolerantes. Estes autores purificaram e caracterizaram uma serina proteinase da levedura Antártica *L. antarticum*, cuja máxima atividade (83 U.mg⁻¹) ocorreu em 25°C e pH=8,5. De acordo com os resultados obtidos, esta enzima apresentou alta estabilidade em temperaturas menores que 30°C, porém a 35°C o tempo de inativação foi reduzido em 03 vezes (150 e 50 minutos respectivamente) e a 55°C foi de apenas 34 segundos. Os mesmos autores ainda observaram que além da influência do pH e da temperatura isoladamente, a interação entre estes dois parâmetros também pode ser determinante para a atividade de proteases.

Com relação às características de proteases produzidas por fungos psicrotolerantes e mesófilos, análise comparativa de alguns trabalhos revelou que, após a

purificação, a atividade máxima destas enzimas ocorreu em temperaturas entre 40 e 60°C, independentemente do pH ótimo, conforme pode ser observado na Tabela 3.5. Entretanto, pela análise das informações contidas nesta tabela, pode-se verificar que não há qualquer correlação quanto à estabilidade destas enzimas.

Tabela 3.5 - Características de proteases purificadas, produzidas por fungos mesófilos e psicrotolerantes.

	Micro-organismo	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Estabilidade	Referência
PSICROTOLERANTES	<i>Candida humicola</i>	1,0- 1,2	37	reteve 100% da atividade por 2 horas a 15, 22 ou 37°C. Totalmente inativada quando incubada por 10 minutos a 56°C	RAY et al., 1992
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	*	55-60	atividade residual de 74-79% após 90 minutos de incubação a 40°C	VAZQUEZ, RUBERTO, MAC CORMACK, 2005
	<i>Aspergillus ustus</i>	9	45	atividade residual de 80 e 55% a 50 e 60°C/10 minutos de incubação	DAMARE et al, 2006
MESÓFILOS	<i>Aureobasidium pullulans</i>	9	45	*	CHI et al., 2007
	<i>Aspergillus oryzae</i>	3,2	55	estável em pH 2,5-6,0 a 30°C/24h e entre 40 e 57°C	VISHWANANTHA, RAO, SINGH, 2009
	<i>Aspergillus awamori</i>	5	55	150, 120, 65 e 15 minutos a 40, 50, 60 e 70°C	NEGI, BANERJEE, 2009
	<i>Cryptococcus</i> sp.	5	30	até 50°C em pH 3,0-7,0 após incubação por 60 minutos	RAO et al., 2011
	<i>Sporisorium reilianum</i>	3	45	*	Mandujano-González et al., 2013
	<i>Aspergillus niger</i>	2,5	50	atividade residual em pH 2,0-4,0 e temperatura abaixo de 40°C/30min. Atividade proteolítica desapareceu a 60°C	YIN et al., 2013

*dados não apresentados pelo autor.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismos

Foram utilizados no presente trabalho 99 leveduras da Antártica, 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), provenientes de diferentes fontes (Tabela 4.1). Estes isolados foram identificados durante a execução deste trabalho, pela equipe da Profa. Dra. Lara D. Sette (UNESP/Rio Claro) e encontram-se depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e da Indústria (CBMAI) da UNICAMP. O isolado L07 (*Rhodotorula mucilaginosa*), selecionado para os ensaios de otimização da atividade proteolítica, encontra-se sob o número de acesso **CBMAI 1528**.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Tabela 4.1 - Linhagens de leveduras da Antártica isoladas no CPQBA/ UNICAMP e suas respectivas fontes de isolamento (*).

Código Linhagem	Fontes
L2, L3, L32, L33, L115, L116, L117, L118, L119, L120, L121, L122, L123, L124	Sedimento marinho
L4, L94, L95, L96, L108, L109a, L110, L111, L112	Estrela do mar
L5, L6, L7, L9, L10, L11, L13, L15	Alga marinha
L17, L18	Caracol marinho
L19, L20, L21	Isópode marinho
L25, L26, L27, L28, L29, L86, L87, L88, L92, L97, L98, L99	Liquen
L34, L35, L36, L37a, L38	Nacella
L42, L43, L44, L45b, L46, L47a, L47b, L48b, L49a	Salpa
L50, L51, L52, L53, L55, L56, L58	Ascídia
L59, L60, L61, L62, L63, L64, L65, L67a, L67b	Ouriço do mar
L70, L71, L72, L73	Esponja do mar
L74, L75, L76, L77, L78, L79, L80, L81, L82, L83, L84	Solo de pinguins
L101, L103, L104, L106, L107, L114	Rocha com líquen

(*) A coleta foi realizada em março de 2010.

4.2 Viabilidade celular e pureza das culturas

A viabilidade celular de 99 isolados de leveduras da Antártica foi verificada por meio de observações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas com solução 0,01% (p/v) de azul de metileno (ODUMERO et al., 1992), enquanto a pureza foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina 1%. As observações foram realizadas em microscópio óptico binocular (LABO) equipado com câmara digital, de forma a fornecer dados referentes à morfologia celular.

4.3 Seleção de leveduras produtoras de proteases

No intuito de obter a individualização das colônias nas placas e definir a temperatura de seleção, foram realizados ensaios preliminares de diluição seriada com 03 isolados de leveduras (L02, L07 e L26) escolhidos aleatoriamente (Figura 4.1).

A avaliação da capacidade de produção de protease extracelular pelos isolados de leveduras da Antártica foi realizada em placas de Petri, a partir do cultivo dos mesmos em meio ágar Sabouraud a 45 g.L⁻¹ (glicose, peptona de carne, peptona de caseína) com 10% de leite desnatado (GEOK et al., 2003). A produção de proteases pelas leveduras foi constatada a partir da formação de um halo claro ao redor das colônias, após 120h de cultivo a 25°C.

Figura 4.1 - Representação esquemática da diluição seriada utilizada para definir a melhor diluição e temperatura para individualização das colônias de leveduras produtoras de proteases.

Fonte: arquivo pessoal.

4.4 Cultivo de isolados de leveduras protease-positivos

As leveduras previamente selecionadas por apresentarem formação de halo claro ao redor da colônia, foram submetidas a experimentos que visam à quantificação da atividade proteolítica, avaliação quanto à concentração e viabilidade celular, além do consumo de açúcares. Assim, as leveduras foram cultivadas por 120 h conforme metodologia especificada abaixo.

4.4.1 Preparo do inóculo e condições de cultivo

O preparo do inóculo para a realização dos cultivos foi realizado a partir de células preservadas por ultracongelamento em criotubos (1ml) com solução de glicerol 10% (v/v) a -80°C. Após o completo descongelamento, o conteúdo do criotubo foi transferido assepticamente para o meio Caldo Sabouraud 30 g. L⁻¹ (glicose, peptona de carne, peptona de caseína), pH 5,5 e as células cultivadas em incubadora de movimento

rotatório (New Brunswick, Scientific Co. Inc.) a 150 rpm, 25°C por 24h. As células recém-ativadas foram obtidas por centrifugação ($2000 \times g$, 15 min^{-1}), semeadas em agar Sabouraud inclinado e mantidas a 25°C por 48h. Alçadas desta cultura recém-repicada foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 ml, contendo 50ml de meio Caldo Sabouraud, pH 5,5, onde as leveduras foram cultivadas em incubadora de movimento rotatório a 150 rpm, 25°C por 24h. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação a $2000 \times g$, 15 min^{-1} , lavadas em água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante, foram utilizadas para preparar uma suspensão de células a qual foi empregada como inóculo.

Para a realização dos cultivos, inóculo padronizado de cada levedura (1.10^8 céls. ml^{-1}) foi transferido para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio Caldo Sabouraud 30 g. L^{-1} (pH 5,5), onde as culturas foram incubadas durante 120 horas sob agitação de 150 rpm a 25°C e amostras foram retiradas a cada 24h.

Foi realizado um trabalho preliminar para avaliar a importância da adição de leite desnatado ao meio de cultivo, visto que o mesmo foi utilizado para a seleção das leveduras proteolíticas em placas. Este trabalho revelou que a adição deste nutriente resultou em diminuição da atividade proteolítica e por este motivo, não foi adicionado ao meio de cultivo nas etapas posteriores.

4.5 Estabelecimento de condições de cultivo para o favorecimento da produção de proteases pela levedura selecionada

Planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} foi realizado com o emprego da levedura *R. mucilaginosa* L07, selecionada do cultivo em meio Caldo Sabouraud. Este isolado foi cultivado em diferentes meios a partir de inóculo de 24h, conforme já descrito (item 4.4.1) e concentração celular inicial de 10^8 céls. ml^{-1} , com a finalidade de se avaliar o impacto da variação de nutrientes e parâmetros físico-químicos sobre a atividade de proteases extracelulares, visando ainda à otimização da atividade proteolítica pela levedura selecionada.

Em função da necessidade de vários ensaios, tubos de ágar Sabouraud inclinado com repiques da levedura *R. mucilaginosa* L07 recém-ativada foram mantidos em geladeira a 4°C por períodos de até 10 dias.

As variáveis avaliadas foram pH e temperatura do meio de cultivo, a concentração de cloreto de sódio (NaCl) e a concentração da fonte nitrogênio, conforme planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} (RODRIGUES; IEMMA, 2009) (Tabelas 4.2 e 4.3). Com o intuito de avaliar a natureza da fonte de nitrogênio, foram utilizadas 02 fontes orgânicas ou complexas (peptona e extrato de farelo de arroz) deste nutriente e uma fonte inorgânica (sulfato de amônio) em diferentes concentrações.

Todas as variáveis foram preparadas em dois níveis, designados como -1 para o inferior e +1 para o superior (Tabela 4.2). Três ensaios no ponto central foram acrescentados à matriz para a determinação do erro padrão durante a análise dos resultados. Os cálculos para verificação dos efeitos das variáveis sobre as respostas foram realizados com o auxílio do programa computacional STATISTICA versão 7.0. Todos os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50 ml de meio de cultivo, por 120 h a 150 rpm, sendo as amostras colhidas a cada 24 h (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h).

A avaliação destes fatores foi feita empregando-se meio de cultivo contendo glicose (20 g. L^{-1}) como fonte de carbono e no caso do farelo de arroz, sua adição ao meio ocorreu na forma extrato de farelo de arroz, conforme Arruda et al. (2011).

Tabela 4.2 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} com ponto central.

Fator	Níveis		
	-1	0	+1
pH	4,0	6,0	8,0
Temperatura (°C)	10,0	17,5	25,0
NaCl (g.L^{-1})	0	2,5	5,0
Peptona (g.L^{-1})	0	5,0	10,0
Sulfato de amônio(g.L^{-1})	0	1,0	2,0
Extrato de Farelo de arroz (g.L^{-1})	0	10,0	20,0

Tabela 4.3 - Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} com triplicata no ponto central (valores codificados), para identificar as variáveis significativas para a produção de proteases pelo isolado com maior atividade proteolítica.

Ensaios	pH	Temperatura	NaCl	Peptona	Sulfato de amônio	Extr. de farelo de arroz
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0

Planejamento fatorial completo do tipo Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 (DCCR 2^3) com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central (RODRIGUES, IEMMA, 2009), foi realizado com base nos resultados do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , visando otimização da atividade proteolítica pela levedura selecionada (*R. mucilaginosa* L07). Neste planejamento experimental foram estabelecidas três variáveis independentes: peptona, farelo de arroz e glicose, conforme Tabela 4.4, estando a matriz do planejamento fatorial completo (DCCR 2^3) apresentada na Tabela 4.5.

Todos os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio de cultivo, utilizando-se as condições físico-químicas que propiciaram favorecimento da atividade proteolítica durante planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , ou seja pH 4,0 e temperatura de 10°C /120 h a 150 rpm, com a retirada de amostras a cada 24h.

A validação do modelo proposto pelo DCCR 2^3 foi realizada por meio de cultivo nas condições em que o valor predito (y) pelo modelo revelou a maior atividade proteolítica. Assim, o meio de cultivo para levedura *R. mucilaginosa* L07 foi composto de 10 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de extrato de farelo de arroz, mantendo-se as

demaís condições de cultivo conforme o planejamento fatorial completo (pH 4,0 e 10°C). Experimento controle foi realizado paralelamente ao teste do modelo, utilizando-se o ensaio 1 do DCCR 2³, que durante realização do planejamento fatorial completo resultou em maior atividade proteolítica (Tabela 4.6). Estes experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio de cultivo, por 120 h a 150 rpm.

Tabela 4.4 - Valores codificados e reais das variáveis utilizadas no planejamento fatorial completo 2³ (DCCR).

Variáveis	Valores codificados				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Peptona (g.L ⁻¹)	10	11	12,5	14	15
Farelo Arroz (g.L ⁻¹)	10	14	20	26	30
Glicose (g.L ⁻¹)	10	14	20	26	30

Tabela 4.5 - Matriz do planejamento fatorial completo 2³ com 6 pontos axiais e 3 repetições no ponto central (DCCR), visando otimização da atividade proteolítica pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07.

ENSAIOS	Peptona	Farelo Arroz	Glicose
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0

Tabela 4.6 - Condições de cultivo de *R. mucilaginosa* L07 para validação do modelo proposto pelo DCCR 2³: **(A)** Condição de cultivo que resultou em maior (**y**) predito e **(B)** experimento controle (ensaio 1 do DCCR 2³). Os cultivos foram realizados em pH 4,0 e 10°C, a 150 rpm por 120h.

Nutrientes (g.L ⁻¹)	Cultivo	
	A	B
Glicose	10	14
Peptona	10	11
Extr. Farelo	10	14

4.6 Determinação da concentração de proteína solúvel

A determinação da concentração de proteínas totais no extrato livre de células foi realizada pelo método de BRADFORD (1976), empregando-se albumina bovina cristalizada (BSA - Merck) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como corante. A concentração de proteína solúvel foi determinada por espectrofotometria a 595nm.

4.7 Caracterização parcial da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07

4.7.1 Efeitos da temperatura e pH sobre a atividade proteolítica

A temperatura ótima para a atividade proteolítica foi determinada no extrato livre de células resultante do cultivo da levedura em condição validada pelo teste do modelo proposto (t= 96h), sobre o substrato Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,0 (conforme item 4.8.4.), com variação da temperatura do ensaio de 10 a 70°C (10, 20, 30 37, 45, 50, 60 e 70°C).

O pH ótimo para a atividade proteolítica foi determinado com o mesmo extrato utilizado para avaliação da temperatura ótima, sobre substrato Azocaseína 1% (p/v) em tampão McIlvane (pH 5,0-8,0) na temperatura ótima (50°C).

4.7.2 Avaliação da estabilidade térmica da enzima

A estabilidade térmica da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07, foi avaliada por meio da incubação do extrato livre de células da condição de cultivo validada (t=96h),

sem o substrato, em temperaturas entre 10-70°C, por 1h e 3h. Após a incubação, foi determinada a atividade proteolítica residual sobre Azocaseína 1% (p/v) em pH 5,0 e temperatura ótima (50°C).

4.8 Métodos analíticos

4.8.1 Deteminação da concentração celular

A determinação da concentração celular (n° céls. ml^{-1}) foi realizada por meio de contagem em Câmara de Neubauer, sendo as células previamente coradas pela adição de igual volume de suspensão celular e uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO et al., 1992)

4.8.2 Determinação da concentração de glicose, etanol e glicerol

As concentrações de glicose, etanol e glicerol, foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; volume da amostra injetada, 20 μL . As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE).

4.8.3 Determinação de pH

Os valores de pH das amostras e meios de cultivo foram determinados por potenciometria, por meio de um aparelho da marca Micronal modelo B 474, com ajuste de temperatura.

4.8.4 Determinação da atividade proteolítica

A atividade proteolítica foi determinada por espectrofotometria a 430nm no extrato livre de células (0,5 ml), pela digestão de 0,5 ml Azocaseína 1% preparada em tampão acetato de sódio 50 mM (pH 5,0) a 37°C. Após 40 minutos de incubação a reação

foi parada pela adição de 0,5 ml de Ácido Tricloroacético 10% (p/v) e centrifugada a 4025 x g por 15 minutos. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a liberação de corante azo (em 0,5 ml do sobrenadante) revelado por uma solução de KOH 0,5N (0,5 ml), de modo que $\Delta A/\Delta t = 0,001/\text{min}$. (CHARNEY; TOMARELLY, 1947; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006 modificado: tampão Tris-HCl 0,2M pH 7,2).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade e pureza dos isolados de leveduras da Antártica

Quanto à viabilidade e pureza dos isolados recebidos, verificou-se, sem exceção, isolados puros e viáveis, com morfologia celular preservada, conforme pode ser constatado na Figura 5.1, a partir de alguns representativos das diferentes morfologias encontradas.

5.2 Diluição seriada para a seleção de leveduras proteolíticas isoladas na Antártica

Para a realização dos testes para diluição seriada foram selecionados aleatoriamente três isolados, L02, L07 e L26, como forma representativa de avaliação do crescimento das colônias de leveduras em placas de Petri com meio ágar Sabouraud com leite (10%).

Os resultados obtidos por meio da incubação dos isolados em meio ágar Sabouraud com leite (10%), em diferentes diluições a 15 e 25°C, são apresentados na Tabela 5.1. Verifica-se nesta tabela que, embora os isolados sejam provenientes do ambiente Antártico, à temperatura de 15°C o crescimento foi inferior àquele verificado a 25°C, o que sugere que as leveduras utilizadas para determinar a diluição adequada, não são psicrófilas, e sim adaptadas às condições do frio polar. Desta forma, poderiam ser consideradas psicrotolerantes, conforme relatado por Buzzini et al (2012). Estes micro-organismos são psicrófilos facultativos que, apesar de crescerem em temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água, apresentam maior crescimento acima de 20°C (CAVICCHIOLI et al., 2002; BUZZINI et al., 2012).

Observa-se ainda na Tabela 5.1 que independentemente da temperatura, com a diluição 10^{-2} não houve o isolamento das colônias de leveduras, sendo consideradas incontáveis. Portanto, a partir dos cultivos a 25°C, em que o crescimento foi favorecido pelo aumento de temperatura, selecionou-se a diluição 10^{-5} , na qual se verificou número significativo de colônias individualizadas, entre 30 e 300 colônias nas placas, para melhor visualização e contagem (PELCZAR, 1996).

Figura 5.1 - Imagens de microscopia óptica (microscópio óptico binocular LABO) de alguns isolados originais: **(A)** lâminas à fresco (magnificação de 400x) e **(B)** células coradas com fucsina (magnificação de 1000x).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5.1 - Número de unidades formadoras de colônias (UFC.ml⁻¹) após o plaqueamento dos isolados selecionados (L02, L07 e L26) em diferentes diluições seriadas.

DILUIÇÃO	ISOLADO 2 (L2)		ISOLADO 7 (L7)		ISOLADO 26 (L26)	
	15°C	25°C	15°C	25°C	15°C	25°C
10⁻²	I*	I*	I*	I*	I*	I*
10⁻⁴	7,6.10 ²	33.10 ²	6,5.10 ²	39.10 ²	6,3.10 ²	40.10 ²
10⁻⁵	0,7.10 ²	3,5.10 ²	0,8.10 ²	2,4.10 ²	0,7.10 ²	3,6.10 ²
10⁻⁷	**	0,5.10 ²	**	0,5.10 ²	**	0,8.10 ²

(I*) = incontáveis

(**) = não houve crescimento

5.3 Seleção de leveduras produtoras de proteases

A fim de evidenciar a formação de halos transparentes indicativos da produção de proteases as leveduras isoladas de diferentes amostras marinhas e terrestres do continente Antártico foram submetidas à seleção quanto à produção de proteases em temperatura moderada (25°C) em ágar Sabouraud com leite (10%), sendo realizada a avaliação das placas de cultivo a cada 24h, por cinco dias. De acordo com os resultados obtidos, dentre os 99 isolados de leveduras avaliados, 14,14% apresentaram halo claro ao redor das colônias (Figura 5.2.), indicativo da degradação de proteínas em meio ágar Sabouraud com leite (10%) (L02, L07, L26, L34, L38, L49a, L52, L65, L67b, L69, L73, L95, L109a e L110).

Vários pesquisadores evidenciaram a habilidade de algumas leveduras para produzir proteases (RAY *et al.*, 1992; TURKIEWICZ *et al.*, 2003; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006). Entretanto, a maioria das proteases comerciais, principalmente as neutras e alcalinas são produzidas por bactérias, principalmente as do gênero *Bacillus*. Por outro lado, proteases ácidas, neutras ou alcalinas podem ser produzidas por fungos, tendo suas atividades na faixa de pH de 4,0 a 11,0 com alta especificidade pelo substrato (RAO *et al.*, 1998).

Figura 5.2 - Evidências fotográficas da formação do halo indicativo da produção de proteases, nas placas de cultivo selecionadas.

Paralelamente à seleção dos isolados produtores de proteases, as leveduras foram identificadas pela equipe da Profa. Dra. Lara D. Sette (UNESP/Rio Claro). Na Tabela 5.2 pode ser observada a identificação das leveduras protease-positivas, além do diâmetro do halo encontrado após 120 h de cultivo e sua fonte de isolamento. Nesta tabela também se verifica que a formação do halo indicativo da produção de proteases pelas leveduras não foi imediata, sendo observado somente após 72h de cultivo. Esta ocorrência pode sugerir que a produção destas enzimas esteja relacionada à fase estacionária de crescimento celular, ou ainda que a necessidade de adaptação das leveduras ao meio de cultivo tenha levado ao adiamento da produção das proteases.

A relação direta entre a produção de proteases e a fase estacionária de crescimento foi abordada por vários pesquisadores (RAY et al., 1992; MANACHINI; FORTINA, 1998; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; GUPTA; KHARE, 2007; ABIDI; LIMAM; NEJIB, 2008). Inclusive, Gupta et al. (2002) sugerem a produção de proteases seja regulada pela limitação de nutrientes do meio de cultivo e que o prolongamento da fase estacionária pode ser utilizada como estratégia para elevar a produção destas enzimas por bactérias.

A maioria das leveduras protease-positivas da Antártica, avaliadas no presente trabalho, é do Filo Basidiomycota (92,86%), a saber: *Rhodotorula mucilaginosa* (L7, L26, L34, L38, L49a, L52, L65, L67b, L69, L73), *Guehomyces pullulans* (L109a), *Cryptococcus adeliensis* (L95, L110), e apenas uma Ascomycota (*Metschnikowia australis*- L2), de acordo com dados fornecidos pelo DRM/CPQBA UNICAMP (Figura 5.3), sendo que a proporção de leveduras isoladas com relação à fonte de isolamento pode ser verificada na Figura 5.4.

Pode-se ainda observar que de acordo com a Tabela 5.2 e Figura 5.3, a levedura da espécie *R. mucilaginosa* foi a mais prevalente dentre os isolados protease-positivos encontrados. Não existem relatos na literatura sobre a produção de proteases por esta espécie. Embora existam poucos trabalhos que reportam a produção destas enzimas por leveduras, podemos mencionar o realizado por Liu e Hatano (1974), que evidenciaram a produção de uma protease aspártica por *R. glutinis*, ativa em pH ácido.

Tabela 5.2 - Isolados de leveduras selecionados à partir da formação de halo transparente ao redor da colônia, indicativo da produção de proteases (+) ou (-), fonte de isolamento da levedura e diâmetro do halo encontrado após 120h.

LEVEDURA	FONTE DE ISOLAMENTO	TEMPO (h)					DÍÂMETRO do HALO (cm)
		24	48	72	96	120	120
<i>Metschnikowia australis</i> (L02)	Sedimento marinho	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	1,7
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L07)	Alga	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L26)	Líquen	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	1,1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L34)	<i>Nacella concinna</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L38)	<i>Nacella concinna</i>	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	0,8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L49a)	<i>Salpa</i> sp	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	0,4
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L52)	Ascídia	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,6
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L65)	Ouriço do mar	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,7
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L67b)	Ouriço do mar	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,7
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L69)	Ouriço do mar	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,8
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (L73)	Esponja do mar	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	0,8
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L95)	Estrela do mar	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	1,5
<i>Guehomyces pullulans</i> (109a)	Estrela do mar	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	0,9
<i>Cryptococcus adeliensis</i> (L110)	Estrela do mar	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	0,9

Figura 5.3 - Número de leveduras protease-positivas em função da espécie identificada

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5.4 - Proporção de leveduras protease-positivas em relação à fonte de coleta no continente Antártico.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com Ogrydziak (1993), as proteases desempenham papel chave para a patogênese de leveduras em humanos. Como a levedura *R. mucilaginosa* tem sido relacionada, nas últimas décadas, com infecções oportunistas em indivíduos imuno comprometidos e idosos (LUNARDI et al., 2006; TUON; COSTA, 2008; FUNG et al., 2009; WIRTH; GOLDANI, 2012), é razoável supor que esta espécie apresente atividade proteolítica.

5.4 Avaliação da atividade proteolítica das leveduras selecionadas

A atividade de protease extracelular foi avaliada no extrato livre de células de todas as leveduras selecionadas como protease-positivas (conforme apresentado na Tabela 5.2), a cada 24h de cultivo em Caldo Sabouraud (glicose, peptona de carne, peptona de caseína), pela liberação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA), provenientes da digestão de azocaseína.

Todos os isolados protease-positivos na seleção em ágar Sabouraud (n=14) mostraram alguma atividade sobre o substrato utilizado, sendo a maior atividade proteolítica ($33,35 \text{ U.mL}^{-1}$) observada com a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07 em 120h de cultivo, seguida pelos isolados L52, L34, L26, L38, L65, L49a, L73, L69, L2, L109a, L67b, L95 e L110 respectivamente (Figura 5.5). Este resultado foi 96,18% superior ao observado por Ray et al. (1992), em estudos com a levedura *C. humicola*, proveniente da Antártica, em meio YNB sem aminoácidos, com glicose e BSA. Segundo estes autores, esta levedura produziu uma protease ácida com máxima atividade (17 U), após 72h de cultivo a 22°C.

Apesar de serem escassas as pesquisas relacionadas à produção de proteases por leveduras, o gênero *Rhodotorula* já foi estudado quanto à produção de uma protease ácida aspártica (LIU; HATANO, 1974) e recentes estudos têm apontado este gênero como potencial produtor de enzimas proteolíticas (VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013). A espécie *Rhodotorula mucilaginosa*, encontrada em uma grande diversidade de ambientes, inclusive extremos (LIBKIND et al., 2008; VAZ et al., 2011; DUARTE et al., 2013), é comumente associada à produção de carotenóides (AKSU; EREN, 2005; MALDONADE; RODRIGUEZ-AMAYA; SCAMPARINI, 2012). Porém, não foram encontrados relatos na literatura sobre a produção de proteases extracelulares por esta levedura.

Figura 5.5 - Atividade proteolítica das leveduras protease-positivas isoladas em diferentes fontes do continente Antártico, sobre o substrato Azocazeína 1%, em função do tempo de cultivo a 25°C em Caldo Sabouraud.

Fonte: Arquivo pessoal

De forma semelhante, os resultados do presente estudo foram também superiores aos apresentados em ensaios com 03 diferentes linhagens da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia* isoladas no solo da Antártica e cultivadas em caldo nutriente suplementado com $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cujas atividades de protease extracelular foram de 24,56, 24,6 e 26,66 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$, respectivamente para as linhagens ANT 7-1, YOA-3 e ANT 1-1 entre 20 e 24°C (VAZQUEZ; RUBERTO; MAC CORMACK, 2005). Entretanto, o meio reacional para avaliação da atividade proteolítica foi tamponado com pH alcalino (8,0), o que sugere uma falta de identidade com a atividade proteolítica das leveduras do presente estudo, em termos comparativos, já que neste caso o meio reacional foi tamponado com pH ácido (5,0).

Por outro lado, os resultados encontrados no presente trabalho foram expressivamente inferiores aos observados com leveduras isoladas da região Amazônica e cultivadas em extrato de malte suplementado com gelatina (SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006). Estes autores observaram atividade máxima com a levedura *Candida intermedia* (273 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$), seguida por *Candida aquatica* (255 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$) e *Candida guilliermondii* (80 $\text{U} \cdot \text{ml}^{-1}$). Entretanto, como o meio reacional foi tamponado em pH 7,2, talvez também neste caso haja uma falta de identidade com a protease produzida por *R. mucilaginosa* L07 no presente estudo.

A análise dos resultados expressos na Figura 5.6 permite verificar que os máximos valores de atividade proteolítica extracelular foram obtidos em 96 horas de cultivo ou após este período, o que coincidiu com a fase estacionária de crescimento celular. Entretanto, a maior produção destas enzimas ocorreu nas primeiras 24h de cultivo para a maioria das leveduras, o que coincidiu com a fase exponencial de crescimento microbiano (Figura 5.7).

Assim como no presente trabalho, uma avaliação dos resultados de diversos autores permitiu constatar a existência de uma correlação entre a fase estacionária de crescimento celular e a máxima atividade proteolítica com diferentes micro-organismos e em variadas condições de cultivo (GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; VAZQUEZ; RUBERTO; MAC CORMACK, 2005; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; GUPTA; KHARE, 2007; ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008), uma vez que essa atividade é regulada pela limitação dos nutrientes do meio de cultivo e também pela produção de biomassa (GUPTA et al., 2002).

Figura 5.6 - Atividade proteolítica (■), produção de biomassa (■), consumo de glicose (■), produção de etanol (■) e glicerol (■) pelas leveduras protease-positivas, isoladas do continente Antártico, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5.6 (continuação) - Atividade proteolítica (■), produção de biomassa (■), consumo de glicose (■), produção de etanol (■) e glicerol (■) pelas leveduras protease-positivas, isoladas no continente Antártico, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5.7 – Velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (■) e de produção de protease extracelular (μ_P) (■) das leveduras isoladas no continente Antártico em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C.

Figura 5.7 (continuação) – Velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (■) e de produção de protease extracelular (μ_P) (■) das leveduras isoladas no continente Antártico em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C.

É importante ainda considerar as particularidades dos micro-organismos, em função do efeito repressor que a glicose pode exercer, visto que o meio de cultivo utilizado no presente trabalho (caldo Sabouraud) contém glicose (20 g. L⁻¹) como fonte de carbono. Este efeito foi constatado por Patel, Dodia e Singh (2005), na produção de proteases por *Bacillus* sp, com diminuição de 120U.ml⁻¹ para 4U.ml⁻¹, quando houve o aumento de 0,2 para 2% (p/v) na concentração de glicose do meio de cultivo. Do mesmo modo Gupta e Khare (2007) encontraram que a produção de proteases pela bactéria *P. aeruginosa* foi reprimida pela presença de glicose no meio de cultivo, observando-se redução de 50% na atividade proteolítica em comparação com as demais fontes estudadas (carboximetilcelulose, glicerol, sacarose, maltose e frutose). Já no caso da cepa industrial de *B. licheniformis*, foi verificado que a maior atividade enzimática de protease (2450 U.ml⁻¹), ocorreu com a concentração de 60 g.L⁻¹ de glicose no meio de cultivo (EL

ENSHASY et al., 2008), considerada excessiva por Patel, Dodia e Singh (2005) e Gupta e Khare (2007), citados anteriormente.

De forma geral, verificou-se no presente trabalho, que para a maioria das leveduras avaliadas, há uma correlação direta entre o máximo crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de protease extracelular (Figura 5.6 A, B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,M). Entretanto, no caso dos isolados L95 e L110 (Figura 5.6 L, N), embora o crescimento destas leveduras (expressivamente maior, quando comparado com os demais isolados) e a privação de nutrientes no meio de cultivo fossem indicativos da produção de proteases, observou-se apenas uma produção basal destas enzimas. Este fato sugere que o efeito indutor da caseína presente no leite, quando realizada a seleção (meio ágar Sabouraud com leite 10%), seja de fundamental importância para a produção de proteases extracelulares por estas leveduras, em função da ocorrência de halo, evidenciando a atividade proteolítica (conforme Figura 5.2).

Ainda no caso dos isolados L95 e L110 (Figura 5.6 L, N), verificou-se que o rápido consumo de glicose (100% em 24 h de cultivo) resultou na produção de etanol e glicerol, os quais foram consumidos durante o cultivo, provavelmente para garantir suprimento de energia. Fato semelhante também foi constatado por Arruda e Felipe (2009) em pesquisas com a levedura *Candida guilliermondii*, na qual estes autores observaram a produção de etanol em meio de cultivo complexo, o qual foi consumido principalmente quando a xilose, utilizada como fonte de carbono, foi totalmente utilizada.

Alguns autores têm relatado que a presença de indutores como caseína e casaminoácidos no meio de cultivo pode incrementar a produção de proteases por micro-organismos (PATEL; DODIA; SHING, 2005; WANG et al., 2008). Segundo Wang et al. (2008), a caseína foi a fonte de nitrogênio que exerceu o maior efeito indutor sobre a produção de protease alcalina pela bactéria psicrófila *Colwellia* sp. NJ 341, quando comparada a outras fontes (peptona, uréia, nitrato de potássio, gelatina, extrato de levedura, farelo de soja e sulfato de amônio).

Outra hipótese a ser investigada é a de que a presença de etanol no meio de cultivo (produzido pelos isolados L95 e L110) possa ter promovido um resultado falso positivo (halo transparente), quando realizada a seleção das leveduras em ágar Sabouraud com leite (10%). O'Connell et al. (2003), reportaram uma diminuição da turbidez do leite em presença de etanol, que é acentuada pelo aumento da temperatura,

e pode sofrer variações, dependendo do pH do meio e da concentração de etanol, em virtude das mudanças que ocorrem com as micelas de caseína.

5.5 Estabelecimento de condições de cultivo para o favorecimento da produção de proteases pela levedura selecionada

Considerando que, dentre os isolados avaliados, a máxima atividade proteolítica ($33,35 \text{ U.ml}^{-1}$) ocorreu durante o cultivo de *R. mucilaginosa* L07 em meio Caldo Sabouraud a 25°C , os experimentos seguintes ocorreram com a finalidade de se avaliar o impacto da variação de nutrientes e parâmetros físico-químicos sobre a atividade proteolítica extracelular desta levedura, na tentativa de estabelecer as condições que favorecessem a atividade enzimática. Neste caso, os cultivos prosseguiram não em Caldo Sabouraud, mas sim em meios formulados com glicose (20 g.L^{-1}) e demais nutrientes como variáveis independentes, conforme planejamento experimental fatorial fracionado 2^{6-2} (Tabela 5.3). Nesta tabela verifica-se que os resultados das atividades proteolíticas obtidos ao final de cada cultivo (após 120 h) variaram muito, sendo máxima ($23,98 \text{ U.ml}^{-1}$) em condições de pH e temperatura em seus níveis mínimos, ou seja $4,0$ e 10°C , respectivamente, enquanto para a peptona e extrato de farelo de arroz, esta máxima atividade ocorreu em seus níveis máximos (10 e 20 g.L^{-1} , respectivamente).

Ao se avaliar estatisticamente os efeitos das variáveis empregadas utilizando o software Statistica 7.0, verificou-se que a variável peptona foi a única variável significativa para a produção de proteases ao nível de significância de 10% ($p < 0,1$), conforme pode ser observado na Tabela 5.4 e nos resultados plotados no Diagrama de Pareto (Figura 5.8), confirmando o seu efeito positivo sobre a atividade proteolítica. De modo coincidente, Queiroga, Pintado e Malcata (2012), ao utilizarem o delineamento experimental para otimizar a síntese de protease por uma nova linhagem de *Bacillus* sp, encontraram efeitos significativos sobre a produtividade de protease em função da concentração de peptona e temperatura ($1,4 \text{ g.L}^{-1}$ e 43°C).

Tabela 5.3 - Planejamento Fatorial Fracionado 2^{6-2} para avaliação da influência de 6 fatores (valores reais) sobre a atividade proteolítica extracelular da levedura *R. mucilaginosa* L07, após cultivo por 120h.

Ensaio	pH	Temperatura (°C)	NaCl (g/L)	Peptona (g/L)	Sulfato de amônio (g/L)	Extr. de farelo de arroz (g/L)	Atividade Proteolítica (U. ml ⁻¹)
1	4	10	0	0	0	0	0,88
2	8	10	0	0	2	0	0
3	4	25	0	0	2	20	0,15
4	8	25	0	0	0	20	0
5	4	10	5	0	2	20	1,29
6	8	10	5	0	0	20	0,85
7	4	25	5	0	0	0	0,24
8	8	25	5	0	2	0	3,63
9	4	10	0	10	0	20	23,98
10	8	10	0	10	2	20	8,84
11	4	25	0	10	2	0	3,49
12	8	25	0	10	0	0	5,19
13	4	10	5	10	2	0	13,09
14	8	10	5	10	0	0	3
15	4	25	5	10	0	20	7,43
16	8	25	5	10	2	20	8,78
17	6	17,5	2,5	5	1	10	3,4
18	6	17,5	2,5	5	1	10	2,88
19	6	17,5	2,5	5	1	10	2,97

Tabela 5.4 - Estimativa dos efeitos das variáveis avaliadas no Planejamento Fatorial Fracionado 2^{6-2} , ao nível de significância de 10% ($p < 0,1$), para a produção de proteases pela levedura *R. mucilaginosa* L07 proveniente da Antártica.

Fator	Nível inferior	Nível superior	Efeito	Erro Padrão	p-valor
	-1	1			
Mediana			4,74158	1,056292	0,000741
pH	4	8	-2,5325	2,302135	0,292882
Temperatura (°C)	10	25	-2,8775	2,302135	0,235154
NaCl (g.L ⁻¹)	0	5	-0,5275	2,302135	0,822623
Peptona (g.L ⁻¹)	0	10	8,345	2,302135	0,003483
Sulfato de amônio (g.L ⁻¹)	0	2	-0,2875	2,302135	0,902683
Extrato de farelo de arroz (g.L ⁻¹)	0	20	2,725	2,302135	0,259456

Figura 5.8 - Diagrama de Pareto, onde se observa o efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) de 6 variáveis na produção de proteases por *R. mucilaginosa* L07.

Fonte: Arquivo pessoal.

É importante salientar que nas condições em que a fonte orgânica de nitrogênio (peptona) esteve em seu nível mínimo (zero), a atividade proteolítica também foi mínima. Diferente resultado foi observado para a fonte de nitrogênio inorgânica (sulfato de amônio), já que a sua adição não resultou em melhoria da atividade enzimática. Ao contrário, os resultados obtidos sugerem uma diminuição da produção de protease quando este nutriente foi acrescentado ao meio de cultivo (Tabela 5.3: ensaio 13). Esta ocorrência também foi observada por outros autores que avaliaram a produção de proteases por diferentes micro-organismos (CHAROENCHAI et al., 1997; AL-SHERI e MOSTAFA, 2004; PATEL; DODIA; SHING, 2005; GUPTA; KHARE, 2007). Com efeito, para as leveduras *P. anomala* e *C. pulcherrima*, pesquisadores sugeriram que a produção de proteases extracelulares por leveduras é reprimida por fontes de nitrogênio prontamente disponíveis, visto que ocorre aumento na produção destas enzimas em meios carentes de aminoácidos e sulfato de amônio (CHAROENCHAI et al., 1997). Também para *C. humicola* foi verificada uma redução drástica na atividade proteolítica na presença de aminoácidos

e sulfato de amônio, além de aumento da atividade com a utilização de BSA (Bovine Serum Albumin) como fonte de nitrogênio, o que reforça o efeito de indução destas enzimas em presença de proteínas complexas (RAY et al., 1992).

Também em estudos com a bactéria *Bacillus* sp. foi constatado um aumento na atividade proteolítica extracelular com a utilização de nitrogênio orgânico, enquanto verificou-se a diminuição do crescimento e da atividade enzimática quando a fonte de nitrogênio utilizada foi inorgânica (cloreto de amônio, sulfato de amônio e nitrato de amônio)(PATEL; DODIA; SHING, 2005). Entretanto, para a levedura marinha *A. pullulans*, a atividade proteolítica foi beneficiada pela utilização de fonte inorgânica de nitrogênio (nitrato de sódio), ao passo que fontes orgânicas, inclusive as complexas, diminuíram muito a produção destas enzimas (CHI et al., 2007).

Quanto ao farelo de arroz, embora a presença deste nutriente no meio de cultivo não tenha se mostrado significativa, não resultou em efeito negativo sobre a atividade proteolítica da levedura *R. mucilaginosa* L07. A adição deste nutriente ao meio de cultivo teve o intuito de promover o aproveitamento de um subproduto agro-industrial, o que é uma tendência mundial, pois além de serem fontes de nutrientes acessíveis, contribuem para o estabelecimento de metodologias sustentáveis no desenvolvimento de novos processos. Neste sentido, pesquisas realizadas por diversos autores já evidenciaram o favorecimento da produção de proteases pelo emprego destas fontes, como é o caso do farelo de soja (EL ENSHASY et al., 2008; VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009), do farelo de trigo (VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009) e do farelo de girassol (MUKTAR; HAQ, 2009).

Também as variáveis pH e temperatura, embora não tenham sido significativas de acordo com a análise estatística (Tabela 5.4), em seu nível mínimo (pH 4,0 e 10°C), não exerceram efeito negativo sobre a produção de protease, visto que a maior atividade proteolítica foi evidenciada em seu nível mínimo. É importante salientar que estes parâmetros físico-químicos foram avaliados por alguns pesquisadores como sendo fatores limitantes para a produção de proteases por micro-organismos (KUMAR; TAKAGI, 1999; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; TURKIEWICZ et al., 2003; PATEL; DODIA; SINGH, 2005). Da mesma forma que no presente trabalho, a levedura psicrotolerante *C. humicola* também apresentou maior secreção de proteases em baixa temperatura (4°C) (RAY et al., 1992), bem como a levedura psicrofílica *Leucosporidium antarcticum* 171 (TURKIEWICZ et al.,

2003). Turkiewicz et al. (2003), verificaram que para *L. antarcticum* 171, a produção de proteases foi dependente da temperatura, sendo máxima entre 5-6°C.

A constatação de máxima produção de proteases em baixas temperaturas por leveduras psicotolerantes, como é o caso do presente trabalho, sugere que estratégias de adaptação enzimática como mudanças estruturais destas enzimas possam possibilitar alta atividade nestas condições. Estas estratégias adaptativas, como a menor quantidade de ligações de hidrogênio e de pontes de dissulfeto, possibilitam aumento na flexibilidade das enzimas e como consequência, maior atividade enzimática (GOMES; STEINER, 2004; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006). De acordo com Feller e Gerday (2003), a redução da hidrofobicidade, diminuição de interações iônicas e eletrostáticas e aumento da carga de resíduos de superfície, também são fatores que determinam maior flexibilidade.

Com relação ao pH, o maior valor de atividade proteolítica foi evidenciado em pH 4,0, sendo de 23,98 U.ml⁻¹, no ensaio 9, o que sugere que a protease produzida por *R. mucilaginosa* L07 tenha um caráter ácido. Semelhante ao presente trabalho, a levedura psicotolerante *C. humicola* apresentou máxima atividade proteolítica quando cultivada em pH 4,0, em meio YNB com BSA e glicose (RAY et al., 1992). Segundo Charoenchai et al. (1997), embora a secreção de enzimas proteolíticas por leveduras não seja uma propriedade comum, a maioria dos trabalhos na literatura apontam para a produção de aspartil proteases ácidas.

A análise dos resultados encontrados permitiu observar ainda que não houve favorecimento da resposta (atividade proteolítica) quando o cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado (Tabela 5.3). De fato, conforme o diagrama de Pareto (Figura 5.7), a sua presença no meio de cultivo, atuou de forma negativa sobre a atividade proteolítica da levedura avaliada, diferentemente do que era esperado, visto se tratar de levedura marinha. Além disso, Manachini e Fortina (1998) evidenciaram aumento de 150% na atividade proteolítica de *B. licheniformis* halotolerante de sedimentos marinhos, quando utilizaram água do mar no meio de cultivo e não somente NaCl, o que foi atribuído a uma particularidade em variedades específicas da bactéria.

É importante ressaltar, que assim como na seleção das leveduras, verificou-se nos ensaios realizados durante o planejamento experimental com a levedura *R. mucilaginosa* L07, uma correlação entre a condição de máximo crescimento celular e a atividade proteolítica (Figura 5.9), salientando-se que a maior atividade proteolítica destas enzimas

ocorreu no tempo final de cultivo e que em ambos os casos a fonte de nitrogênio orgânica (peptona) esteve na maior concentração proposta (10 g.L^{-1}).

Figura 5.9 - Atividade proteolítica (■) e biomassa (■) da levedura *R. mucilaginosa* L07, em cultivos realizados por meio de planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , após 120h de cultivo a 150rpm.

A análise dos resultados obtidos com o Planejamento Fatorial 2^{6-2} , com vistas ao estabelecimento de condições para o favorecimento da atividade proteolítica da levedura *R. mucilaginosa* L07 selecionada na triagem em Caldo Sabouraud, revelou que não houve melhoria no valor da atividade proteolítica nas condições propostas, visto que a atividade inicial ($33,35 \text{ U. ml}^{-1}$) obtida com a triagem das leveduras a 25°C em meio caldo Sabouraud foi superior à maior atividade encontrada durante os ensaios do planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} ($23,98 \text{ U.ml}^{-1}$). Várias hipóteses podem ser consideradas para esta ocorrência, como, por exemplo, os frequentes repiques da levedura para manutenção em geladeira, em ambiente extremamente diverso do habitat original (Antártica).

Os frequentes repiques da levedura *R. mucilaginosa* L07 para manutenção em geladeira podem ter provocado, em curto prazo, a alteração de vias metabólicas da levedura, a exemplo do que foi observado com a diminuição da pigmentação da mesma. Ao longo do tempo, a cor rósea, característica desta levedura no início dos experimentos, passou a ter menor intensidade, ou mesmo ocorrendo a descoloração (Figura 5.10). Segundo Russel (2008), a produção de carotenoides não polares figura como uma das estratégias de adaptação de micro-organismos a condições extremas, como as baixas temperaturas e radiação ultra violeta. Neste caso, é provável que na ausência de alguns

estímulos do ambiente Antártico, estratégias de adaptação, como a pigmentação e o aumento na atividade enzimática também estejam ausentes.

Há que se considerar ainda o fato de que a variação na concentração da fonte de carbono (glicose), não foi avaliada neste planejamento.

Figura 5.10 - Evidências fotográficas da despigmentação da levedura *R. mucilaginosa* L07, proveniente da Antártica: (A) Colônias em meio ágar Sabouraud com leite (10%); (B) Repiques em agar Sabouraud ao longo do tempo (Fev/12, Fev/13, Mar/13 e Mai/13); (C) Evidência em maior escala dos repiques realizados em Fev/12 e Mai/13.

Fonte: Arquivo pessoal.

Deste modo, com o intuito de otimizar a atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07, foi proposto o planejamento fatorial completo (Delineamento Composto Central Rotacional 2^3 – DCCR 2^3). A utilização desta ferramenta propiciou a variação nutricional do meio de cultivo, com base nos nutrientes utilizados no ensaio que proporcionou a maior atividade proteolítica no planejamento fatorial fracionado, mantendo-se constantes as variáveis físico-químicas (pH 4,0 e temperatura 10°C) por 120 h.

De acordo com a matriz do DCCR 2^3 apresentada na Tabela 5.5, a maior atividade proteolítica (39,18 U.mL⁻¹) foi observada no ensaio 1, em que as concentrações de nutrientes foram de 11,14 e 14 g.L⁻¹, respectivamente para peptona, extrato de farelo de arroz e glicose.

A análise dos coeficientes de regressão das variáveis e das interações entre elas estão apresentadas na Tabela 5.6. De acordo com esta tabela, as variáveis peptona quadrática, farelo de arroz linear e a interação peptona versus farelo de arroz e farelo de arroz versus glicose não influenciaram no valor de atividade enzimática, a 95% de confiança (p-valor igual ou inferior a 0,05). Ainda nesta tabela observa-se que, as variáveis

peptona linear, glicose linear e a interação peptona versus glicose foram significativas, influenciando negativamente a atividade enzimática. Positivamente, a atividade enzimática foi influenciada pelas variáveis significativas: farelo de arroz quadrático e glicose quadrática.

A realização da regressão múltipla (Tabela 5.6) levou à proposição de um modelo matemático. O modelo de segunda ordem envolveu todos os termos do polinômio com exceção das variáveis não significativas (peptona quadrática, farelo de arroz linear, interação peptona versus farelo de arroz e farelo de arroz versus glicose). Os coeficientes de regressão em termos dos valores codificados das variáveis aparecem na equação do modelo de segunda ordem **(3)**, em que **y** é a resposta predita (Tabela 5.5).

$$y = 30,51 - 3,76 \text{ peptona} + 1,34 (\text{farelo de arroz})^2 - 3,32 \text{ glicose} + 1,14 (\text{glicose})^2 - 2,27 (\text{peptona} \times \text{glicose}) \quad (3)$$

Tabela 5.5 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 (valores codificados) com suas respectivas respostas (atividade enzimática) após 120h de cultivo, resposta predita, erro absoluto e erro relativo.

Ensaio	Peptona	Farelo de arroz	Glicose	U.ml ⁻¹	y predito	Erro absoluto	Erro relativo
1	-1	-1	-1	39,18	37,8	1,38	0,37765
2	1	-1	-1	36,98	34,82	2,155	0,34762
3	-1	1	-1	35,96	37,80	-1,845	0,37851
4	1	1	-1	33,78	34,82	-1,04	0,34851
5	-1	-1	1	34,09	35,70	-1,605	0,35747
6	1	-1	1	24,63	23,64	0,99	0,23599
7	-1	1	1	35,69	35,70	-0,015	0,35700
8	1	1	1	22,56	23,64	-1,08	0,23688
9	-1,68	0	0	38,54	36,83	1,7082	0,36782
10	1,68	0	0	24,02	24,10	-0,1782	0,24201
11	0	-1,68	0	35,57	34,29	1,272984	0,34256
12	0	1,68	0	33,42	34,29	-0,872016	0,34318
13	0	0	-1,68	38,82	39,31	-0,485136	0,39318
14	0	0	1,68	29,06	28,15	0,905064	0,28118
15	0	0	0	32,15	30,51	1,635	0,30459
16	0	0	0	26,90	30,51	-3,615	0,30644
17	0	0	0	31,29	30,51	0,78	0,30485

Tabela 5.6 - Coeficiente de regressão do planejamento experimental completo 2³

Variáveis	Coeficiente de regressão	Erro padrão	T	P
Média	30,14828	1,054198	28,59831	0,000000
(1)Peptona (L)	-3,76434	0,495350	-7,59935	0,000126*
Peptona (Q)	0,28467	0,545716	0,52164	0,618015
(2)Farelo de arroz(L)	-0,76979	0,495350	-1,55403	0,164125
Farelo de arroz(Q)	1,42465	0,545716	2,61061	0,034882*
(3)Glicose(L)	-3,32179	0,495350	-6,70595	0,000276*
Glicose(Q)	1,22801	0,545716	2,25028	0,059174*
Peptona X Farelo de arroz	-0,45375	0,646920	-0,70140	0,505695
Peptona X Glicose	-2,27625	0,646920	-3,51860	0,009746*
Farelo de arroz X Glicose	0,74250	0,646920	1,14775	0,288781

L – linear; Q- quadrático; Nível de confiança: <0,05; * variáveis significativas

O modelo quadrático ajustado da superfície de resposta foi avaliado através da análise de variância (ANOVA), Tabela 5.7.

Tabela 5.7 - ANOVA do modelo quadrático para a produção de proteases pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* (L07)

Fonte de Variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	F calculado (Fcal)
Regressão	416,64	5	83,328	23,8203742
Resíduo	38,48	11	3,498181818	
F ajuste	22,62	9	2,513333333	
Erro puro	15,86	2	7,93	
Total	455,12	16	28,445	

R²= 91%; F_{tabelado}:5;11;0,05 =3,20; p-valor = 0,001

A ANOVA do modelo de regressão quadrático demonstrou que o modelo é significativo, como é evidente pelo teste de Fisher (teste-F= F_{calculado} =23,82) maior que F_{tabelado} (3,20). Em adição, a porcentagem de variação explicada pela equação R², foi de 91%, com p-valor de 0,001, ou seja, o modelo matemático proposto representa 91% dos resultados obtidos. Cabe ressaltar que os valores obtidos ficaram próximos dos valores previstos pelo modelo (Tabela 5.5). Neste sentido, as superfícies de resposta (Figuras 5.11 e 5.12) indicam que o planejamento ficou próximo do ponto de otimização da atividade

proteolítica, o que está evidente principalmente na Figura 5.11 que representa a interação entre a concentração de peptona e de glicose.

Figura 5.11 - Superfície de resposta para a produção de proteases por *R. mucilaginosa* L07, em relação à concentração de farelo de arroz e peptona.

Figura 5.12 - Superfície de resposta para a produção de proteases pela levedura *R. mucilaginosa* L07, em relação à concentração de peptona e glicose.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com o predito pelo modelo (Equação (3) e Figura 5.12) a atividade enzimática foi favorecida nos menores níveis testados de peptona e de glicose. Entretanto, para o farelo de arroz, independente da concentração utilizada, a atividade permanece alta, sendo influenciada apenas pela peptona (Figura 5.10) em concentrações inferiores ao ponto central ($12,5 \text{ g.L}^{-1}$).

Observou-se no DCCR 2^3 o favorecimento da atividade enzimática com concentrações de glicose inferiores às utilizadas no planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} (de 20 g.L^{-1} para 10 g.L^{-1}). Este fato demonstra que, embora esta seja fonte de carbono universal, a alta concentração de glicose no meio de cultivo, pode resultar em consequências negativas. Em alguns estudos, particular importância tem sido dada à redução na produção de proteases devido à concentração de glicose no meio (KUMAR; TAKAGI, 1999; PATEL; DODIA; SINGH, 2005; GUPTA; KHARE, 2007). De acordo com Patel, Dodia e Singh (2005), foi constatada uma diminuição na atividade proteolítica de 120 U.ml^{-1} para 4 U.ml^{-1} com o aumento de 0,2 para 2% (p/v) da concentração de glicose do meio para cultivo de *Bacillus* sp. Resultado semelhante foi encontrado por Gupta e Khare (2007), segundo os quais a habilidade de utilizar diferentes fontes de carbono, varia conforme a espécie. Estes autores observaram a produção de protease quando diferentes fontes de carbono (carboxi metil celulose, glicerol, frutose e maltose) foram utilizadas no meio de cultivo da bactéria *P. aeruginosa*, com exceção da glicose. Segundo estes autores, a utilização deste nutriente resultou em repressão da produção de protease por esta bactéria. Chi et al. (2007) também verificaram uma redução na atividade proteolítica com a utilização de glicose como fonte de carbono no cultivo da levedura *A. pullulans*, enquanto observaram máxima atividade em meio de cultivo contendo amido solúvel a 2,5% (p/v).

Assim como a fonte de carbono, a fonte de nitrogênio complexa (peptona) utilizada no presente trabalho, também afetou de modo significativo a produção de protease pela levedura *R. mucilaginosa* L07, conforme já demonstrado com o planejamento fatorial fracionado 2^{6-2} , onde concentrações abaixo de 10 g.L^{-1} de peptona resultaram em atividade enzimática mínima, sendo este o único fator significativo. Porém, segundo o DCCR 2^3 , a utilização de peptona favoreceu a produção de protease quando esta fonte de nitrogênio esteve em concentrações inferiores ao ponto central

(12,5 g.L⁻¹). Além disso, de acordo com o predito pelo modelo matemático, a concentração mais adequada deste nutriente no meio de cultivo de *R. mucilaginosa* L07, visando o favorecimento da produção de protease é de 10 g . L⁻¹. Do mesmo modo, pesquisas realizadas por outros autores revelaram que a fonte de nitrogênio afeta grandemente a produção de proteases (GUPTA et al., 2002; CHI et al.,2007; GUPTA; KHARE; 2007; ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008). Entretanto, é importante lembrar que diferentes micro-organismos podem apresentar diferentes exigências nutricionais, reagindo de forma diversa às condições do meio de cultivo.

A fim de verificar a adequação do modelo, a produção da enzima foi testada sob as condições otimizadas do meio de cultivo, previstas pelo modelo. Com base nos resultados observados pela superfície de resposta e visando um aumento da atividade proteolítica, a validação do modelo foi realizada com 10 g.L⁻¹ de peptona, 10 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de extrato de farelo de arroz, mantendo-se as demais condições de cultivo descritas para o planejamento fatorial completo (pH 4,0 e 10°C). Experimento controle foi realizado paralelamente ao teste do modelo, utilizando 11 g.L⁻¹ de peptona, 14 g.L⁻¹ de glicose e 14 g.L⁻¹ de extrato de farelo de arroz (ensaio 1 do DCCR 2³), condição esta que resultou em maior atividade proteolítica durante realização do planejamento completo.

A maior atividade proteolítica (48,55 U. ml⁻¹) observada com a validação do modelo ocorreu após 96 h de cultivo da levedura *R. mucilaginosa* L07 nas condições previstas pelo modelo, o que resultou em uma diferença de 3,11% em relação ao controle. Os resultados deste teste podem ser observados nas Figuras 5.12 e 5.13, que confirmam a adequação do modelo.

Durante o teste de adequação do modelo também foi possível observar mais uma vez, uma correlação direta entre a máxima atividade proteolítica, o máximo crescimento da levedura e o esgotamento da fonte de carbono do meio de cultivo (Figuras 5.13 e 5.14). De modo coincidente, vários autores já constataram a existência de uma correlação entre a produção de proteases e o crescimento dos micro-organismos estudados, verificando-se, na maioria dos trabalhos, que a maior produção de proteases ocorre na fase estacionária de crescimento (RAY et al., 1992; GUPTA; BEG; LORENZ, 2002; SILVA NEVES; PORTO; TEIXEIRA, 2006; GUPTA; KHARE, 2007; ABIDI; LIMAN; NEJIB, 2008).

Figura 5.13 - Atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07, em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições preditas pelo modelo e no experimento controle (DCCR 2³ – E1).

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 5.14 - Consumo de glicose (linhas descontínuas) e produção de biomassa (linhas contínuas) por *R. mucilaginosa* L07, em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições preditas pelo modelo e no experimento controle (DCCR 2³ – E1).

Fonte: Arquivo pessoal

Foi avaliada também a atividade específica da protease produzida pela levedura *R. mucilaginosa* L07, em função da concentração de proteínas solúveis no extrato livre de células, após cultivo em meio proposto pelo modelo validado do DCCR 2³. A variação da concentração de proteínas totais (proteínas constituintes do meio e protease produzida) e a atividade específica da protease avaliada em condições ótimas estão ilustradas na

Figura 5.15. Verifica-se nesta figura, que a maior atividade proteolítica específica (38,73 U. mg⁻¹) da levedura *R. mucilaginosa* L07, foi encontrada em 120 h de cultivo em meio proposto pelo modelo matemático, quando a concentração de proteínas solúveis no meio de cultivo foi mínima (4,86 mg . ml⁻¹).

Portanto, em função dos resultados encontrados com esse planejamento (DCCR 2³) e validação do modelo proposto, fica evidente que a atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07 foi influenciada diretamente pela limitação de nutrientes do meio de cultivo, bem como pela relação carbono (C): nitrogênio (N). De fato, segundo Gupta et al. (2002), a produção de proteases é regulada pela limitação de nutrientes do meio. Ainda segundo estes autores, a relação C:N influencia a produção de proteases por micro-organismos, podendo esta ser aumentada com o prolongamento da fase estacionária de crescimento, na qual a maioria das proteases é produzida, com a alimentação contínua.

Figura 5.15 - (A) Proteínas totais (BRADFORD, 1976), (B) Atividade específica (U.mg⁻¹). Parâmetros determinados no extrato livre de células em função do tempo de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2³ de *R. mucilaginosa* L07.

Fonte: Arquivo pessoal.

A estratégia do planejamento experimental completo (DCCR 2³) utilizada no presente trabalho, permitiu evidenciar um aumento de 102,46% na atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07 quando comparada ao melhor resultado obtido com o planejamento fatorial fracionado 2⁶⁻², passando de 23,98 para 48,55 U.ml⁻¹. Inicialmente optou-se por selecionar as variáveis com foco na redução do número de ensaios, pois

pouco era conhecido sobre o processo. Nesta primeira triagem foram avaliados os efeitos principais e as variáveis que influenciaram no processo, de acordo com um modelo linear. Na segunda fase, a mais bem sucedida técnica usada para análise e otimização das variáveis de um processo, o planejamento fatorial completo, possibilitou a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre a produção da enzima. Ao final, a metodologia de superfície de resposta pode ser empregada para obtenção de um modelo teórico e dedução das condições otimizadas.

5.6 Caracterização parcial da protease produzida por *Rhodotorula mucilaginosa* L07

A fim de estabelecer a temperatura e pH ótimos para a atividade proteolítica extracelular da levedura *R. mucilaginosa* L07, foram realizados ensaios à partir do extrato livre de células do cultivo teste para validação do modelo proposto ($t = 96\text{h}$), o qual propiciou máxima atividade proteolítica ($48,55\text{ U.ml}^{-1}$).

A influência da temperatura sobre a atividade proteolítica da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07 foi avaliada com o substrato Azocaseína 1% (p/v), sendo máxima ($71,14\text{ U.ml}^{-1}$) a 50°C , conforme apresentado na Figura 5.16. Também se verifica nesta figura, que aproximadamente 70% da atividade proteolítica foi conservada, após ensaios em 37°C e 80% após ensaios em 45 e 60°C .

Porém, essa versatilidade da protease de *R. mucilaginosa* L07, evidenciada no presente trabalho, não pode ser considerada padrão para as leveduras psicotolerantes. Pesquisas realizadas por Ray et al. (1992), visando a caracterização de uma protease ácida produzida por *C. humicola* isolada na Antártica, evidenciaram a termolabilidade desta enzima, visto que a mesma apresentou atividade ótima em 37°C , porém foi inativada após 10 min. a 56°C . De fato, segundo alguns autores (CAVICCHIOLI et al., 2002; FELLER; GERDAY, 2003; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006), a baixa termotolerância das proteases produzidas em baixas temperaturas, está relacionada com o aumento da flexibilidade destas enzimas, em virtude de adaptações estruturais que visam o aumento da atividade enzimática.

Análise comparativa de vários trabalhos já publicados (DAMARE et al., 2006; VISHWANATHA; RAO; SINGH, 2009; NEGI; BANERJEE, 2009; YIN et al., 2013; MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2013) que podem ser observados na Tabela 3.5,

apresentada anteriormente, revelou que a temperatura ótima para a máxima atividade proteolítica da levedura *R. mucilaginosa* L07, selecionada no presente trabalho, se adequa à faixa em que a maioria das proteases fúngicas apresentaram máxima atividade proteolítica (40-60°C), independente do pH ótimo.

Figura 5.16 - Atividade proteolítica extracelular de *R. mucilaginosa* L07, no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2³, em função da variação da temperatura do ensaio sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0.

Fonte: Arquivo pessoal.

A influência do pH sobre a atividade proteolítica extracelular de *R. mucilaginosa* L07, foi avaliada por meio da variação do pH do ensaio enzimático de 5,0 a 8,0, utilizando-se tampão McIlvane na temperatura ótima (50°C) em substrato azocaseína 1% (p/v). Conforme pode ser observado na Figura 5.17, a máxima atividade proteolítica (36,89 U.ml⁻¹) foi evidenciada em pH 5,0. Entretanto, constatou-se nestes ensaios que a atividade enzimática em pH 5,0 com a utilização deste tampão, foi inferior (redução de 48,14%) à apresentada em ensaios realizados em tampão acetato de sódio com o mesmo pH e mesma temperatura (50°C). Provavelmente a inibição da atividade proteolítica ocorreu em virtude da natureza do tampão McIlvane (Fostato/citrato), que pode ter influenciado negativamente o ensaio.

Verifica-se ainda na Figura 5.17, que com o aumento do pH do ensaio houve declínio gradual da atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07, sendo que 74,63% da atividade foi conservada em pH 6,0, enquanto em pH 8,0 observou-se somente 1,2% do valor da atividade enzimática observada em pH 5,0. Resultado semelhante foi observado

por outros pesquisadores, em estudos para caracterização de uma protease ácida do fungo filamentoso *Sporisorium reilianum* (MANDUJANO-GONZÁLEZ et al., 2013). Estes autores verificaram máxima atividade proteolítica em pH 3,0, evidenciando ainda uma queda de 100% na atividade proteolítica quando houve a elevação do pH de 3,0 para 7,0, utilizando o tampão McIlvane. Porém, neste caso, o método utilizado para avaliação da atividade proteolítica teve como substrato a albumina de soro bovino (BSA).

Figura 5.17 - Atividade proteolítica extracelular de *R. mucilaginosa* L07, determinada no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2³, em função da variação do pH do ensaio (5,0-8,0) sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão McIlvane, em temperatura ótima (50°C).

Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando o perfil da atividade proteolítica com relação ao pH, a caracterização da enzima produzida por *R. mucilaginosa* L07, revelou se tratar de uma protease ácida, assim como a maioria das proteases produzidas por fungos (CHAROENCHAI et al., 1997; MUKHTAR; HAQ, 2009; NEGI; BANERJEE, 2009; YIN et al., 2013). Entretanto, há uma dificuldade em correlacionar os diversos trabalhos disponíveis na literatura, em virtude dos diferentes métodos e análises aplicadas (BOSSI; BONIZZATO; ZAPPAROLI, 2006; MUKHTAR, 2009; NEGI; BANERJEE, 2009; YIN et al., 2013; GOGLIETTINO et al., 2014).

É importante registrar que as tentativas de avaliação de valores de pH inferiores a 5,0 se mostraram infrutíferas, visto que o substrato azocaseína se mostrou insolúvel em pH abaixo de 4,8, o que resultou na precipitação deste substrato, independente do tampão utilizado.

Além da caracterização da protease de *R. mucilaginosa* L07 quanto ao pH e temperatura ótimos para a atividade proteolítica extracelular, é fundamental estabelecer sua estabilidade térmica, principalmente pelo fato de se tratar de levedura psicrotolerante, visto que neste caso a maior atividade enzimática é comumente associada à termolabilidade (FELLER; GERDAY, 2003; SIDDIQUI; CAVICCHIOLI, 2006).

A avaliação da estabilidade da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07, foi realizada após a incubação do extrato livre de células em diferentes temperaturas (10-70°C), sobre substrato Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 pelos períodos de 1 h e 3 h. Os resultados apresentados na Figura 5.18 mostram que a enzima apresentou alta estabilidade em temperaturas menores que 60°C, porém, após 1h de incubação nesta temperatura (60°C), verificou-se uma queda de 98,3% na atividade proteolítica, sugerindo uma inativação térmica, conforme reportado por outros autores em relação a enzimas produzidas em baixas temperaturas (GERDAY et al., 2000; DAMARE et al., 2006; RAO et al., 2011; YIN et al., 2013). De modo semelhante ao presente trabalho, Rao et al (2011) encontraram que uma protease ácida produzida pela levedura *Cryptococcus* sp., após purificada e caracterizada, revelou atividade máxima a 30°C, mostrando-se estável por até 1h a 50°C, com redução drástica de sua atividade enzimática a 60°C. Assim também uma protease aspártica ácida, produzida pelo fungo *A. niger* BCRC 32720, que apresentou atividade proteolítica máxima em 50°C, mostrou perda total da atividade após incubação por 30 min em 60°C.

A avaliação da estabilidade enzimática após 3h de incubação do extrato livre de células (Figura 5.18) revelou que a atividade proteolítica extracelular residual de *R. mucilaginosa* L07 foi mantida entre 10 e 45°C e que não foi mais que 65% do valor inicial a 50°C, sendo a enzima completamente inativada a 60°C. Por outro lado, Damare et al. (2006) ao trabalharem fungos marinhos, observaram que uma variedade do fungo *A. ustus* psicrotolerante produziu uma protease que apresentou atividade residual de 50% após apenas 10 min de incubação a 60°C. Coincidentemente, a levedura *C. humicola* isolada na Antártica, produziu uma protease ácida que foi totalmente inativada quando incubada por 10 min a 56°C. Ainda quanto à estabilidade térmica, deve-se considerar que esta também guarda forte identidade com a espécie avaliada (YIN et al., 2013).

Figura 5.18 - Atividade proteolítica residual, após 1h e 3h de incubação do extrato livre de células de *R. mucilaginosa* L07 (obtido no teste do modelo proposto pelo DCCR 2³) em diferentes temperaturas (10-70°C), sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0.

Fonte: Arquivo pessoal.

É importante mencionar que, embora a protease evidenciada no presente trabalho seja proveniente de uma levedura isolada na Antártica (*R. mucilaginosa* L07), a mesma não mostrou a instabilidade térmica típica de proteases psicrófilas, o que também já foi observado por outros autores (VAZQUEZ; RUBERTO; MACCORMACK, 2005; KIM; LEE; JUNG, 2005).

Outros fatores também são apontados em estudos para a avaliação da atividade e estabilidade de proteases microbianas, como por exemplo, o efeito sinérgico entre temperatura e pH (TURKIEWICZ et al., 2003). Turkiewicz et al. (2003) observaram que uma protease neutra produzida pela levedura *L. antarticum* retém totalmente a atividade proteolítica na temperatura 5°C, por 30 minutos em um intervalo de pH entre 4,0 - 10,0. Por outro lado, estes mesmos autores verificaram que em temperaturas mais elevadas, o intervalo de pH para a estabilidade desta mesma protease é mais estreito.

6. CONCLUSÃO

Dentre 99 isolados de leveduras provenientes da Antártica, 14,14% foram capazes de produzir proteases em placas com ágar Sabouraud com leite (10%). Para a maioria dos isolados avaliados (12 leveduras), foi possível constatar uma correlação direta entre o máximo crescimento celular, o consumo de glicose e a produção de protease extracelular quando cultivados em caldo Sabouraud. Entretanto, este padrão não prevaleceu para 14,14% das leveduras protease positivas (n=2), o que sugere que a caseína é um indutor de fundamental importância para a produção de proteases por estes isolados. Dentre as leveduras selecionadas, a maior atividade proteolítica (33,36 U.mL⁻¹) foi aferida com a levedura *R. mucilaginosa* L07, após cultivo em caldo Sabouraud, motivo de sua utilização em um planejamento experimental visando o favorecimento desta atividade, o que resultou em um aumento de 45,53% do valor inicial. Este planejamento possibilitou a obtenção de um modelo matemático validado, o qual revelou que a atividade enzimática foi favorecida em baixas concentrações de peptona e de glicose. A caracterização da protease produzida por *R. mucilaginosa* L07 revelou seu caráter ácido, cuja máxima atividade (71,14 U.mL⁻¹) foi obtida em pH 5,0 a 50°C. Esta protease mostrou-se altamente estável após incubação por 1h em temperaturas abaixo de 60°C, verificando-se manutenção da atividade proteolítica nestas temperaturas. Esta versatilidade, aliada à atividade enzimática sugerem que esta protease exibe potencial para utilização em processos biotecnológicos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a produção de protease por *R. mucilaginosa* L07 após cultivo desta levedura em biorreator, sob diferentes condições de oxigenação.
- Purificar a protease ácida produzida por *R. mucilaginosa* L07 e caracterizar a enzima purificada quanto aos inibidores e aminoácidos do sítio ativo.
- Utilizar as demais leveduras protease-positivas visando o favorecimento da produção de proteases.
- Caracterizar as proteases produzidas pelas diferentes linhagens de leveduras protease-positivas do presente estudo.
- Estudar as diferentes linhagens da levedura *R. mucilaginosa* utilizadas no presente estudo, visando a obtenção de carotenóides.
- Explorar o potencial biotecnológico das leveduras utilizadas no presente estudo, quanto à obtenção de outros bioprodutos como antimicrobianos e biossurfactantes.

REFERÊNCIAS

ABIDI, F.; LIMAM, F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by *Botrytis cinerea* using economic raw materials: Assay as biodetergent. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p. 1202–1208, 2008.

AGYEI, D.; DANQUAH, M. K. Industrial-scale manufacturing of pharmaceutical-grade bioactive peptides. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 272–7, 2011.

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

AL-SHERI, M.A.; MOSTAFA, S.Y. Production and some properties of protease produced by *Bacillus licheniformis* isolated from Tihamet Asser, Saudi Arabia. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 7, p. 1631-1635, 2004.

ANENZ, B.E., HELD, B.H., JURGENS, J.A., FARRELL, R.L., BLANCHETTE, R.A. Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross sea region of Antarctica. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 3057-3064, 2006.

ALAM, S. I. *et al.* Purification and characterisation of extracellular protease produced by *Clostridium* sp. from Schirmacher oasis, Antarctica. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 5-6, p. 824–831, 2005.

ANSELMO, A.M. *et al.* Enzimas em Catálise Ambiental. In: BON, E.P. **Enzimas em biotecnologia- produção, aplicações e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 387-405.

ARENZ, B. E.; BLANCHETTE, R. A. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 308–315, 2011.

ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v.58, p. 274-278, 2009.

ARRUDA, P. V. *et al.* Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, p. 815-822, 2011.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 204–209, 2013.

BARRETT, A J.; RAWLINGS, N. D.; O'BRIEN, E. A. The MEROPS database as a protease information system. **Journal of Structural Biology**, v. 134, n. 2-3, p. 95–102, 2001.

BELLOC, A. *et al.* Rhone-Poulenc Industries. **Microrganism and proteolytic enzyme derived therefrom**. U.S. 4288556, 16 Aug. 1977, 08 Sep. 1981.

BINOD, P. *et al.* Industrial enzymes - present status and future perspectives for India. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.72, p.271-286, 2013.

BON, E.P. *et al.* Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: BON, E.P. **Enzimas em Biotecnologia- Produção, Aplicações e Mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 463-488.

BOSSI, A.; BONIZZATO, L.; ZAPPAROLI, G. Acidic Extracellular Proteases from Microorganisms of Fairly Acidic Niche. **Protein & Peptide Letters**, v. 13, n. 7, p. 737–741, 2006.

BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BUZZINI, P. *et al.* Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 82, n. 2, p. 217–41, 2012.

CAVICCHIOLI, R.*et al.* Low-temperature extremophiles and their applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 253–261, 2002.

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

CHAROENCHAI, C. *et al.* Screening of non- *Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 3, p. 2–8, 1997.

CHAUD, L.C.S.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Revista Nucleus**, v.6, n.2, p. 33-46, 2009.

CHERRY, J. R.; FIDANTSEF, A. L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438–443, 2003.

CHI, Z. *et al.* Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 3, p. 236–55, 2009.

CHI, Z. *et al.* Optimization of medium and cultivation conditions for alkaline protease production by the marine yeast *Aureobasidium pullulans*. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 534–8, 2007.

CHOI, J.h. et al. Novel thrombolytic protease from edible and medicinal plant *Aster yomena* (Kitam.) Honda with anticoagulant activity: Purification and partial characterization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, *in press*, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.03.004>

D'AMICO, S. et al. Psychrophilic microorganisms: challenges for life. **EMBO Reports**, v. 7, n. 4, p. 385–389, 2006.

DAMARE, S. et al. Deep-sea fungi as a source of alkaline and cold-tolerant proteases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 172–181, 2006.

DEEGENAARS, M.L.; WATSON, K. Stress proteins and stress tolerance in an Antarctic, psychrophilic yeast, *Candida psychrophila*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 151, n.2, p. 191–196, 1997.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. *et al.* Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1-6, p. 36–46, 2005.

DUARTE, A W. F. *et al.* Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 17, n. 6, p. 1023–1035, 2013.

DUNN, B.M. Structure and mechanism of pepsin-like family of aspartic peptidases. **Chemical Reviews.**, v. 102, p. 4431–4458, 2002.

EL ENSHASY, E. *et al.* Optimization Of The Industrial Production Of Alkaline Protease By *Bacillus licheniformis* In Different Production Scales. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, n. 3, p. 583–593, 2008.

EL HADJ-ALI, N. *et al.* Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 515–523, 2007.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic. materials. In: SAHA, B.C., HAYASHI KYOSHI (Eds). **Lignocellulose Biodegradation**. Washington: American Chemical Society, 2004. Cap. 18, p. 300–314.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 53, n. 10, p. 830–41, 1997.

FELLER, G.; GERDAY, C. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 1, n. 3, p. 200–8, 2003.

FENICE, M. *et al.* Production of extracellular enzymes by Antarctic fungal strains Collection site. **Polar Biology**, p. 275–280, 1997.

FERRERO, M.A.; CASTRO, G.R.; ABATE, C.M.; BAIGORI, M.D.; SIÑERIZ, F. Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 327-332, 1996.

FLEURI, L.F., SATO, H.H. Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p.871-879, 2005.

FUNG, H. B. *et al.* Rhodotorula mucilaginosa lymphadenitis in an HIV-infected patient. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 13, p. 27–29, 2009.

GEOK, L. P. *et al.* Isolation and screening of an extracellular organic solvent-tolerant protease producer. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1, p. 73–77, 2003.

GEORLETTE, D. *et al.* Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, p. 25–42, 2004.

GERDAY, C. *et al.* Cold-adapted enzymes : from fundamentals to biotechnology. **Tibtech Reviews**, v. 18, n. March, p. 103–107, 2000.

GILBERT, J. A. *et al.* Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. **Microbiology**, v. 150, n. 1, p. 171–180, 2004.

GOGLIETTINO, M.; RICCIO, A.; COCCA, E.; *et al.* A new pepstatin-insensitive thermopsin-like protease overproduced in peptide-rich cultures of *Sulfolobus solfataricus*. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 3204–19, 2014.

GOMES, J., STEINER, W. The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. **Food Technol. Biotechnol**, v. 42, p. 223–235, 2004.

GOMES, E. *et al.* Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

GUO, Z. *et al.* Expression of aspartic protease from *Neurospora crassa* in industrial ethanol-producing yeast and its application in ethanol production. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 2, p. 148–54, 2011.

GUPTA, A.; KHARE, S. K. Enhanced production and characterization of a solvent stable protease from solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 1, p. 11–16, 2007.

GUPTA, R. *et al.* An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 60, n. 4, p. 381–95, 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q. K.; LORENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 15–32, 2002.

INFANTE, I. *et al.* Wool-degrading *Bacillus* isolates: extracellular protease production for microbial processing of fabrics. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 1047–1052, 2009.

JARBOUI, R. *et al.* *Aspergillus niger* P6 and *Rhodotorula mucilaginosa* CH4 used for olive mill wastewater (OMW) biological treatment in single pure and successive cultures. **Environment Technology**, v.34, n. 5-8, p. 629-636, 2013.

JOHNSTON, D. B.; MCALOON, A. J. Protease increases fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. **Bioresource technology**, v. 154, p. 18–25, 2014.

JOSEPH, B., RAMTEKE, P. W. THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 457-470, 2008.

KAPPEN, L., 1993. Lichens in the Antarctic region. In: FRIEDMANN, E.I. (Ed.). **Antarctic Microbiology**. New York: Wiley-Liss, 1993. p. 433–490.

KAWAHARA, H. Cryoprotectants and ice-binding proteins. In: MARGESIN, R. *et al.* **Psychrofiles: from biodiversity to biotechnology**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. p. 229-246.

KAWAHARA, H. *et al.* Stabilization of astaxanthin by a novel biosurfactant produced by *Rhodotorula mucilaginosa* KUGPP-1. **Biocontrol Sci.**, v. 18, n. 1, p. 21-28, 2013.

KIM, J.; LEE, S.; JUNG, H. Characterization of calcium-activated bifunctional peptidase of the psychrotrophic *Bacillus cereus*. **Journal of Microbiology-Seoul-**, v. 43, n. 3, p. 237-243, 2005.

KORTING, H. C.; SCHALLER, M. New developments in medical mycology. **Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete**, v. 52, n. 2, p. 91-97, 2001.

KOHLMANN, K. L. *et al.* Production of proteases by psychrotrophic microorganisms. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3275–83, 1991.

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

KUMAR, D.; BHALLA, T. C. Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, n. 6, p. 726–36, 2005.

KUMURA, H.; ISHIDO, T.; SHIMAZAKI, K. Production and partial purification of proteases from *Aspergillus oryzae* grown in a medium based on whey protein as an exclusive nitrogen source. **Journal of dairy science**, v. 94, n. 2, p. 657–67, 2011.

LIBKIND, D. *et al.* Studies on the heterogeneity of the carotenogenic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* from Patagonia , Argentina. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, p. 93–98, 2008.

LIU, C. L.; HATANO, H. An aspartic acid residue at the active site of *Rhodotorula glutinis* acid protease. **Febs Letters**, v. 42, n. 3, p. 3–5, 1974.

LOSS, S. H. *et al.* Meningite e endocardite infecciosa causada por *Rhodotorula mucilaginosa* em paciente imunocompetente. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, n. 4, p. 507–509, 2011.

LUNARDI, L. W. *et al.* Epidemiology and Outcome of *Rhodotorula* Fungemia in a Tertiary Care Hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 60–63, 2006.

MACHADO, A. *et al.* Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 781-789, 2004.

MAJUMDAR, S. *et al.* Characterization, mechanism of anticoagulant action, and assessment of therapeutic potential of a fibrinolytic serine protease (Brevithrombolase) purified from *Brevibacillus brevis* strain FF02B. **Biochimie**, n. April, p. 1–11, 2014.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from campinas region , Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p. 65–70, 2007.

MALDONADE, I. R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; SCAMPARINI, A. R. P. Statistical optimisation of cell growth and carotenoid production by *Rhodotorula mucilaginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 109-115, 2012.

MANACHINI, P.L.; FORTINA, M.G. Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 565-568, 1998.

MANDUJANO-GONZÁLEZ, V. *et al.* Biochemical study of the extracellular aspartyl protease Eap1 from the phytopathogen fungus *Sporisorium reilianum*. **Protein expression and purification**, v. 92, n. 2, p. 214–22, 2013.

MARGESIN, R. *et al.* **Psychrofiles: from biodiversity to biotechnology**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008. 462p.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in microbiology**, v. 162, n. 3, p. 346–61, 2011.

MAURER, K.H. Detergent proteases. **Current opinion in biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 330–334, 2004.

MERHEB-DINI, C. *et al.* Use of a new milk-clotting protease from *Thermomucor indicae-seudaticae* N31 as coagulant and changes during ripening of Prato cheese. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 859–865, 2012.

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.

MUKHTAR, H; HAQ, I.U. Production of Acid Protease by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. **Pakistan J. Zool.**, v. 41, n. 4, p. 253–260, 2009.

NEGI, S.; BANERJEE, R. Characterization of amylase and protease produced by *Aspergillus awamori* in a single bioreactor. **Food Research International**, v. 42, n. 4, p. 443–448, 2009.

O'CONNELL, J. E. *et al.* Properties of casein micelles reformed from heated mixtures of milk and ethanol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 213, n. 2-3, p. 265–273, 2003.

ODUMERO, J.A.; D'AMORE, T.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. (1992). Effect of heat and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, 10: 111–116.

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

ONOFRI, S. *et al.* *Friedmanniomyces endolithicus* (Fungi, Hyphomycetes), anam-gen and sp nov, from continental Antarctica. **Nova Hedwigia**, v. 68, n. 1, p. 175-182, 1999.

ONOFRI, S. *et al.* Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1657–1664, 2007.

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.

PATEL, R.; DODIA, M.; SINGH, S. P. Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3569–3575, 2005.

PATEL, R. K. *et al.* Purification and characterization of alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 2002–2009, 2006.

PELCZAR, M., CHAN, E. C. S., KRIEG, N. R. **Microbiologia, conceitos e aplicações**. São Paulo. Makron Books do Brasil, 1996, v. 1.

PETINATE, S. D. *et al.* Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 173–177, 1999.

POGSON, M.; GEORGIU, G.; IVERSON, B. L. Engineering next generation proteases. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 4, p. 390–7, 2009.

POLAINA, J., MACCABE, A.P. **Industrial enzymes: structure, function and applications**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 2007. 641p.

QUEIROGA, A C.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Use of response surface methodology to optimize protease synthesis by a novel strain of *Bacillus* sp. isolated from Portuguese sheep wool. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 1, p. 36–43, 2012.

RAO, M. B. *et al.* Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597–635, 1998.

RAO, S. *et al.* Purification and characterization of a novel aspartic protease from basidiomycetous yeast *Cryptococcus* sp. S-2. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 5, p. 441–6, 2011.

RAY, M. K. *et al.* Extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 6, p. 1918–1923, 1992.

ROBINSON, C. H. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. **New Phytologist**, v. 151, n. 2, p. 341–353, 2001.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas, Brasil: Cárita Editora, 2009. 238p.

RODRIGUES, R.C.L.B. **Influência da disponibilidade de oxigênio no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana**. Tese (Doutorado em Biotecnologia). 2005. 246 p. Instituto de Ciências Biomédicas-Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2005.

ROGERS, A. D. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 362, n. 1488, p. 2191–2214, 2007.

RUISI, S. *et al.* Fungi in Antarctica. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 6, n. 1-3, p. 127–141, 2006.

SÁ-PEREIRA, P. *et al.* Biocatálise: estratégias de inovação e criação de mercados. In: BON, E. **Enzimas em biotecnologia- produção, aplicações e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, v. 11, 2008. p. 433-462.

SANTIAGO, L.C.M.A.S.; MOTTA, C.M.S. Isolation of mucorales from processed maize (*Zea mays* L) and screening for protease activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 698–700, 2008.

SHIMIZU, Y.; SUGIYAMA, A.; OHTA, A. **Enzymatic unhairing agent for use in tanning for producing leather and method for enzymatic unhairing treatment**. U.S. Patent 6867032, 2005.

SHIVAJI, S.; PRAKASH, J. S. S. How do bacteria sense and respond to low temperature? **Archives of microbiology**, v. 192, n. 2, p. 85–95, 2010.

SIDDIQUI, K. S.; CAVICCHIOLI, R. Cold-adapted enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, p. 403–33, 2006.

SILVA, C.R.; DELATORRE, A. B.; MARTINS, M. L. L. Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp. and some properties of the enzymatic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 253-258, 2007.

SILVA, D.D.V.; CÂNDIDO, E.J.; SILVA, S.S; FELIPE, M.G.A. Fermentative performance of *Pichia stipitis* and *Candida guilliermondii* yeasts grown in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with different nutrients. IN: 1ST BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE, 1., 2011. Campos do Jordão. Abstracts.

SILVA NEVES, K.C.; PORTO, A.L.F; TEIXEIRA, M.F.S. Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular. **Acta Amazônica**, v. 36, n. 3, p. 299-306, 2006.

SINGH, S. M.; PUJA, G.; BHAT, D. J. Psychrophilic fungi from Schirmacher Oasis , East Antarctica. **Current Sciences**, v. 90, n. 10, p.1388-1392, 2006.

SINGH, P. et al. *Rhodotorula svalbardensis* sp. nov., a novel yeast species isolated from cryoconite holes of Ny-Ålesund, Arctic. **Cryobiology**, v.68, p. 122-128, 2014.

SHIMIZU, Y.; SUGIYAMA, A.; OHTA, A. Daiwa Kasei K. K. **Enzymatic unhairing agent for use in tanning for producing leather and method for enzymatic unhairing treatment**. US 6867032 B2, 05 Dez. 2000, 15 Mar. 2005.

TUON, F. F.; COSTA, S. F. *Rhodotorula* infection . A systematic review of 128 cases from literature. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 25, p. 135–140, 2008.

TURKIEWICZ, M. et al. A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Extremophiles : life under extreme conditions**, v. 7, n. 6, p. 435–42, 2003.

URDIALES, J.L. **Estructura y clasificación de los aminoácidos. Códigos de abreviación**. Disponível em: http://www.biorom.uma.es/contenido/av_biomo/Mat2.html. Acesso em: 03/2014.

VAJZOVIC, A. et al. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3: production of xylitol and ethanol. **Journal of Industrial Biotechnology**, v. 39, n. 7, p. 1003-1011, 2012.

VAZ, A.B.M. *et al.* The diversity, extracellular enzymatic activities and photoprotective compounds of yeasts isolated in Antarctica. **Brazilian journal of Microbiology**, v.42, p. 937-947, 2011.

VAZQUEZ, S. C.; CORIA, S. H.; MAC CORMACK, W. P. Extracellular proteases from eight psychrotolerant antarctic strains. **Microbiological Research**, v. 159, n. 2, p. 157–166, 2004.

VAZQUEZ, S.; RUBERTO, L.; MAC CORMACK, W. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. **Polar Biology**, v. 28, n. 4, p. 319–325, 2004.

VERMELHO, A.B. *et al.* Enzimas Proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: BON, E. **Enzimas em biotecnologia- produção, aplicações e mercado**, Rio de Janeiro: Interciência, v. 11, 2008. p. 273-285.

VISHWANATHA, K.; RAO, A.G.A.; SINGH, S. Characterisation of acid protease expressed from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 402–407, 2009.

WANG, Q. *et al.* Optimization of cold-active protease production by the psychrophilic bacterium *Colwellia* sp. NJ341 with response surface methodology. **Bioresource technology**, v. 99, n. 6, p. 1926–31, 2008.

WIRTH, F.; GOLDANI, L.Z. Epidemiology of *Rhodotorula*: an emerging pathogen. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2012, 2012.

YEGIN, S. *et al.* Aspartic proteinases from *Mucor* spp. in cheese manufacturing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 4, p. 949–960, 2011.

YERGEAU, E.; KOWALCHUK, G. A. Responses of Antarctic soil microbial communities and associated functions to temperature and freeze-thaw cycle frequency. **Environmental Microbiology**, v. 10, n. 9, p. 2223–2235, 2008.

YIN, L.J. *et al.* Characterization of acidic protease from *Aspergillus niger* BCRC 32720. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 3, p. 662–666, 2013.

APÊNDICES

Apêndice A: RESULTADOS DOS PARÂMETROS AVALIADOS DURANTE CULTIVO DOS ISOLADOS PROTEASE-POSITIVOS ISOLADOS NA ANTÁRTICA.

Tabela A.1 Levedura *Metschnikowia australis* L02: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,525	0,73	9,97
	B	0,345	0,86	15,20
	C	0,945	0,86	12,30
24	A	1,650	4,14	9,77
	B	0,195	3,43	7,42
	C	0,960	2,88	9,89
48	A	4,920	4,50	5,80
	B	5,175	4,68	4,86
	C	2,760	6,00	5,88
72	A	2,310	6,83	4,35
	B	1,140	6,10	3,97
	C	4,080	6,18	4,48
96	A	5,700	5,40	1,32
	B	2,520	5,95	1,19
	C	4,380	4,80	1,18
120	A	7,635	5,50	0,00
	B	4,815	4,25	0,00
	C	4,470	4,53	0,00

Tabela A.2 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L07: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	4,575	0,63	14,09
	B	4,485	0,63	13,23
	C	4,620	0,63	13,36
24	A	18,900	1,66	10,40
	B	19,770	1,87	10,00
	C	25,515	2,1	10,16
48	A	37,890	2,4	3,19
	B	35,820	2,8	3,13
	C	21,645	2,2	5,88
72	A	25,380	2,56	3,63
	B	32,550	2,64	3,64
	C	33,690	2,31	2,84
96	A	32,835	2,7	1,76
	B	24,240	3,01	1,11
	C	40,725	2,54	1,62
120	A	32,865	2,44	0,17
	B	39,930	3,14	0,00
	C	27,255	2,53	0,00

Tabela A.3 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L26: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	8,100	0,69	13,49
	B	7,965	0,7	13,40
	C	10,635	0,7	16,01
24	A	21,240	1,55	9,28
	B	27,615	1,32	9,89
	C	18,945	1,26	14,96
48	A	21,645	1,73	6,40
	B	22,305	1,4	4,56
	C	17,130	1,47	10,18
72	A	20,445	2,07	3,63
	B	26,550	2,27	3,92
	C	18,840	2,3	3,30
96	A	30,060	2,47	2,47
	B	24,105	1,77	1,32
	C	24,900	1,69	1,27
120	A	32,670	2,16	0,00
	B	22,995	2,09	0,16
	C	20,625	2,5	0,00

Tabela A.4 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L34: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	1,785	0,38	14,20
	B	2,460	0,39	13,25
	C	2,355	0,39	15,95
24	A	18,165	2,21	11,44
	B	18,360	1,88	9,14
	C	18,045	2,17	11,03
48	A	22,635	3,43	8,23
	B	28,470	4,18	6,29
	C	22,905	3,45	8,37
72	A	14,340	5,5	4,81
	B	28,905	4,6	3,81
	C	28,155	5,56	4,16
96	A	31,125	3,3	0,00
	B	27,015	3,28	1,03
	C	26,550	3,28	0,37
120	A	29,115	3,6	0,00
	B	25,905	2,9	0,00
	C	24,480	2,75	0,00

Tabela A.5 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L38: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	3,285	1,00	12,20
	B	3,660	0,90	13,40
	C	2,355	0,80	12,95
24	A	16,665	2,30	10,44
	B	15,360	2,80	10,14
	C	15,045	2,60	11,22
48	A	19,635	3,63	7,24
	B	19,470	4,18	7,66
	C	19,005	3,65	6,97
72	A	23,340	3,50	3,54
	B	25,905	3,20	3,76
	C	25,155	3,26	4,23
96	A	25,125	3,60	0,00
	B	24,015	3,78	0,00
	C	25,050	3,28	0,00
120	A	27,345	5,20	0,00
	B	27,405	4,90	0,00
	C	24,480	4,75	0,00

Tabela A.6 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L49a: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,315	1,04	13,34
	B	0,135	0,91	10,01
	C	1,020	0,83	9,62
24	A	10,575	2,6	11,93
	B	8,685	1,95	8,42
	C	12,060	2,45	8,23
48	A	11,625	2,28	6,53
	B	10,260	2,05	5,68
	C	9,375	3,28	7,30
72	A	21,840	3,3	5,72
	B	21,285	2,7	6,06
	C	17,715	2,45	5,93
96	A	21,945	3,2	1,38
	B	20,325	2,5	2,07
	C	24,570	3,95	1,28
120	A	24,195	4,35	0,00
	B	24,390	2,93	0,00
	C	20,715	3,43	0,00

Tabela A.7 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L52: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,450	1,27	16,10
	B	1,320	0,94	16,44
	C	1,410	1,20	14,84
24	A	13,800	2,83	10,60
	B	17,355	3,28	10,30
	C	16,095	3,45	9,84
48	A	21,675	3,43	6,48
	B	22,260	3,58	7,07
	C	20,160	3,60	7,11
72	A	29,250	4,08	3,53
	B	27,450	4,05	3,99
	C	23,475	3,20	4,41
96	A	20,520	4,00	0,89
	B	24,930	3,08	0,16
	C	30,450	3,98	0,00
120	A	27,045	4,15	0,03
	B	30,915	3,83	0,04
	C	31,575	4,00	0,00

Tabela A.8 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L65: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	1,095	0,82	10,00
	B	0,525	0,8	13,81
	C	0,510	0,82	12,80
24	A	11,775	2,2	8,64
	B	7,455	2,5	8,95
	C	9,705	2,15	8,18
48	A	12,840	2,38	5,48
	B	11,865	3,63	5,40
	C	14,115	2,63	5,24
72	A	23,415	3,18	4,77
	B	24,150	2,33	5,08
	C	19,470	2,03	5,99
96	A	21,855	3,4	0,40
	B	23,160	2,7	1,52
	C	24,540	3,3	0,54
120	A	25,320	3,25	0,00
	B	23,325	2,85	0,00
	C	24,600	2,83	0,00

Tabela A.9 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L67b: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	1,455	0,97	15,58
	B	1,020	0,87	13,43
	C	1,050	0,81	14,65
24	A	2,850	2,66	12,47
	B	1,725	2,78	13,04
	C	1,050	2,91	10,85
48	A	5,130	2,73	8,29
	B	4,065	2,55	8,56
	C	3,870	2,63	9,43
72	A	4,695	2,00	7,27
	B	4,718	1,80	7,28
	C	2,640	2,13	6,16
96	A	5,535	3,43	5,62
	B	4,110	3,45	5,55
	C	4,095	2,43	5,12
120	A	3,645	2,60	3,06
	B	3,390	2,20	3,53
	C	3,120	2,30	3,21

Tabela A.10 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L69: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,285	0,94	15,28
	B	0,390	0,89	14,63
	C	2,265	0,93	15,62
24	A	4,155	3,01	7,78
	B	4,110	2,84	6,46
	C	5,370	2,86	7,45
48	A	6,285	2,73	6,42
	B	5,805	2,15	6,45
	C	6,645	2,60	5,39
72	A	6,510	2,50	2,41
	B	7,410	2,65	2,55
	C	7,650	2,28	3,78
96	A	7,590	2,75	1,93
	B	6,803	3,45	2,31
	C	5,025	2,40	2,01
120	A	4,440	2,43	0,48
	B	4,740	2,38	0,73
	C	6,810	1,50	0,69

Tabela A.11 Levedura *Rhodotorula mucilaginosa* L73: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,045	1,27	13,53
	B	3,660	0,96	15,85
	C	0,690	1,29	16,62
24	A	8,655	2,4	13,27
	B	6,885	2,4	7,28
	C	6,255	2,35	7,98
48	A	12,480	2,6	7,91
	B	16,140	2,55	4,45
	C	12,150	3	5,25
72	A	17,100	3,93	3,68
	B	16,800	2,98	2,08
	C	16,455	3,08	2,46
96	A	16,155	2,8	0,74
	B	16,095	2,7	0,49
	C	17,940	2,85	0,59
120	A	13,815	3,68	0,00
	B	15,675	3,15	0,00
	C	15,210	3,2	0,00

Tabela A.12 Levedura *Cryptococcus adeliensis* L95: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)	Etanol (g*L ⁻¹)
0	A	0,645	1,83	14,22	0,46
	B	0,210	1,97	14,99	0,58
	C	0,210	1,99	14,58	0,58
24	A	0,855	8,1	0,00	6,52
	B	0,585	7,75	0,00	6,12
	C	0,435	8,7	0,17	5,28
48	A	0,465	6,05	0,00	5,57
	B	0,030	3,65	0,00	5,54
	C	0,495	4,95	0,00	5,33
72	A	1,935	5,65	0,00	3,60
	B	1,410	6,35	0,00	3,38
	C	1,320	7,25	0,00	3,97
96	A	0,165	6,4	0,00	1,99
	B	1,290	9,45	0,00	2,09
	C	1,905	9,6	0,00	1,87
120	A	0,488	12,9	0,00	0,50
	B	0,060	10,7	0,00	0,08
	C	0,990	10,4	0,00	0,32

Tabela A.13 Levedura *Guehomyces pullulans* L109a: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)
0	A	0,615	0,64	16,87
	B	0,930	0,59	13,02
	C	2,175	0,53	14,90
24	A	4,260	1,12	12,54
	B	4,020	0,97	12,56
	C	2,850	1,07	12,32
48	A	4,560	0,8	8,27
	B	4,740	0,83	7,70
	C	3,750	0,68	7,81
72	A	4,605	0,55	4,41
	B	3,600	0,81	6,45
	C	5,040	0,86	3,72
96	A	4,995	0,63	2,48
	B	5,025	0,73	2,98
	C	5,085	0,6	3,72
120	A	4,830	0,6	0,50
	B	6,060	0,78	0,00
	C	4,740	0,6	0,00

Tabela A.14 Levedura *Cryptococcus adeliensis* L110: atividade proteolítica, biomassa celular e consumo de glicose, em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C (amostras em triplicata).

Tempo (h)	Amostra	Atividade enzimática (U.ml ⁻¹)	Biomassa (* 10 ⁸ céls.ml ⁻¹)	Glicose (g*L ⁻¹)	Etanol (g*L ⁻¹)
0	A	0,030	1,03	13,12	0,48
	B	0,000	0,9	12,96	0,41
	C	0,060	1	14,25	0,46
24	A	0,405	8,2	0,00	4,33
	B	0,150	7,23	0,00	5,23
	C	0,435	7,12	0,00	5,18
48	A	1,230	6	0,00	5,27
	B	1,530	5,21	0,00	5,73
	C	0,726	5,33	0,00	5,42
72	A	0,765	5,22	0,00	2,65
	B	0,435	5,1	0,00	1,99
	C	1,298	5,83	0,00	2,03
96	A	0,660	7,3	0,00	0,97
	B	1,050	8,54	0,00	1,10
	C	1,965	7,38	0,00	1,07
120	A	2,145	11,4	0,00	0,43
	B	2,310	10,11	0,00	0,21
	C	2,340	10,39	0,00	0,34

Figura A1 Variação de pH durante cultivo das leveduras protease positivas em função do tempo de cultivo em Caldo Sabouraud a 25°C, 150 rpm.

**Apêndice B: RESULTADOS DO TESTE DE VALIDAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO
PREDITO PELO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL 2³ (DCCR 2³).**

Tabela B1 Atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07 (amostras em triplicata) em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições previstas pelo modelo matemático (teste de validação do modelo).

		TEMPO					
	AMOSTRAS	0	24	48	72	96	120
Atividade proteolítica (U . ml ⁻¹)	A	1,02	7,47	15,12	27,01	50,83	49,26
	B	1,00	7,26	18,84	30,75	48,63	47,91
	C	1,30	4,11	16,29	28,99	46,20	46,58
Biomassa celular (.10 ⁸ céls. ml ⁻¹)	A	1,00	4,10	6,50	8,10	8,30	8,80
	B	1,00	3,70	6,80	8,50	8,20	9,30
	C	1,00	4,10	7,00	8,60	8,00	9,20
Glicose (g. L ⁻¹)	A	11,63	7,83	3,36	0,80	0,60	0,25
	B	11,64	8,07	2,86	0,75	0,70	0,20
	C	11,60	7,87	3,66	0,80	0,60	0,10

Tabela B2 Atividade proteolítica de *R. mucilaginosa* L07 (amostras em triplicata) em função do tempo de cultivo a 150 rpm por 120h, nas condições do experimento controle (DCCR 2³ – E1).

		TEMPO					
	AMOSTRAS	0	24	48	72	96	120
Atividade proteolítica (U . ml ⁻¹)	A	1,71	7,14	20,76	31,79	42,57	45,42
	B	1,41	7,50	18,97	31,25	46,14	47,25
	C	1,98	7,67	18,14	32,94	47,01	48,45
Biomassa celular (.10 ⁸ céls. ml ⁻¹)	A	1,00	4,20	7,00	8,30	8,50	8,50
	B	1,00	4,73	7,20	8,50	8,00	8,30
	C	1,00	5,40	7,30	8,00	8,20	8,00
Glicose (g. L ⁻¹)	A	15,09	11,29	6,54	2,23	1,15	0,00
	B	15,00	11,65	6,02	2,07	0,90	0,89
	C	14,90	10,77	6,16	1,90	0,92	0,90

Apêndice C: RESULTADOS OBTIDOS COM A CARACTERIZAÇÃO DA PROTEASE DE *R. mucilaginosa* L07.

Tabela C1 Atividade proteolítica extracelular de *R. mucilaginosa* L07, no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2³, em função da variação da temperatura do ensaio sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM pH 5,0 (amostras em triplicata).

Temperatura (°C)	Amostras	Atividade proteolítica (U. ml ⁻¹)
10	A	14,61
	B	13,89
	C	12,18
20	A	32,55
	B	32,97
	C	33,24
30	A	42,18
	B	41,7
	C	42,45
37	A	50,26
	B	48,71
	C	49,15
45	A	59,43
	B	58,23
	C	60,33
50	A	73,08
	B	70,8
	C	69,54
60	A	58,17
	B	55,98
	C	54,27
70	A	20,19
	B	17,58
	C	17,37

Tabela C2 Atividade proteolítica extracelular de *R. mucilaginosa* L07, determinada no extrato livre de células após 96h de cultivo em meio proposto pelo modelo no DCCR 2³, em função da variação do pH do ensaio (5,0-8,0) sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão McIlvane, em temperatura ótima (50°C).

pH	Amostras	Atividade proteolítica (U. ml ⁻¹)
5	A	37,41
	B	36,36
	C	36,2
6	A	24,71
	B	24,36
	C	24,77
7	A	13,4
	B	13,22
	C	13,2
8	A	0,68
	B	0,21
	C	0,22

Tabela C3 Atividade proteolítica residual, após 1h e 3h de incubação do extrato livre de células de *R. mucilaginosa* L07 (obtido no teste do modelo proposto pelo DCCR 2³) em diferentes temperaturas (10-70°C), sobre Azocaseína 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 50mM, pH 5,0.

Temperatura (° C)		Atividade proteolítica residual (U . ml ⁻¹)	
		1 h	3 h
10	A	72,45	68,64
	B	66,72	70,05
	C	66,18	70,56
20	A	72,90	72,87
	B	67,77	69,95
	C	68,88	65,19
30	A	68,49	65,19
	B	71,37	72,27
	C	67,41	70,86
37	A	69,30	67,83
	B	67,38	70,44
	C	71,61	68,04
45	A	69,74	68,40
	B	71,64	68,07
	C	68,70	64,53
50	A	70,23	45,15
	B	70,68	45,12
	C	71,82	49,41
60	A	1,65	0,75
	B	0,39	0,03
	C	1,41	0,45
70	A	0,12	0,06
	B	1,74	0,12
	C	1,65	0,09

Apêndice D: DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS NO EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS.

Figura D1 Curva padrão de proteínas: Espectrofotometria a 595nm realizada com Albumina de Soro Bovino (ASB) em diferentes concentrações padrão para determinação da concentração de proteínas solúveis.