

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROTEASES DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO  
MÉDICA**

**ALESSANDRA ALVES DRUMOND SIQUEIRA**

**MANAUS**

**2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**ALESSANDRA ALVES DRUMOND SIQUEIRA**

**PROTEASES DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO  
MÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE, na área de concentração “Entomedicina e Biodiversidade” e na linha de pesquisa “Princípios bioativos pró-saúde em recursos naturais amazônicos”.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Francisca Simas Teixeira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

**MANAUS**

**2012**

**ALESSANDRA ALVES DRUMOND SIQUEIRA**

**PROTEASES DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO  
MÉDICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amazonas, para obtenção do título de MESTRE em CIÊNCIAS DA SAÚDE, na área de concentração “Entomedicina e Biodiversidade” e na linha de pesquisa “Princípios bioativos pró-saúde em recursos naturais amazônicos”.

Aprovada em 29 de março de 2004.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Francisca Simas Teixeira  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup> Dra. Ila Maria Aguiar de Oliveira  
Universidade Federal do Amazonas

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Aos meus pais e irmãos,  
em especial ao meu esposo pelo incentivo  
e dedicação,  
em todos os momentos,  
para realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao mestre da vida, ao Mestre da Sensibilidade e da Inteligência; Àquele cujo falar é muitíssimo suave, doce e agradável para mim: Ao meu amado Deus;

Ao meu precioso esposo, meu amigo fiel: Marcelo Dias Siqueira, teu apoio, teu exemplo e tua dedicação a mim e a este trabalho são inestimáveis;

À minha orientadora, Maria Francisca Simas Teixeira, pelo constante acompanhamento e dedicação;

À minha querida amiga, Ormezinda Celeste Cristo Fernandes, a quem tenho uma gratidão eterna pela sua amizade, sua ajuda foi fundamental para a realização deste projeto;

Aos queridos irmãos em Cristo pelas orações e jejum, intercedendo por mim;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade e a CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação;

Aos meus colegas de turma, em especial à Sandra Regina Sales de Menezes Aquino pelo seu incentivo e amizade;

As minhas queridas amigas Araluce Regina e Elineide Cristina, pela sua amizade e carinho que foram importantíssimos para mim. Vocês são demais! Nunca esquecerei vocês.

À professora Ana Lúcia Figueiredo Porto, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, pelo incentivo, atenção e apoio durante a preparação deste trabalho;

À Lídia e Rafaela, vocês são especiais para mim.

À Kilma Cristiane pela sua companhia e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

As proteases são enzimas que ocupam uma posição central com respeito à aplicação na área médico e industrial. Entre os vários tipos de proteases, utilizadas na indústria farmacêutica e de cosméticos, destacam-se as collagenases utilizadas para amaciamento da pele, higiene oral, na limpeza de feridas purulentas, em processos de cicatrização, queimaduras e como agente anti-trombolítico. Realizou-se este estudo com o objetivo de selecionar leveduras produtoras de proteases, avaliar as melhores condições de crescimento da espécie produtora de protease, caracterizar parcialmente a enzima quanto o pH e temperatura na estabilidade e verificar o efeito desta enzima na degradação do colágeno. Foram analisadas 50 amostras de leveduras isoladas de diferentes substratos, provenientes da coleção de cultura DPUA. As amostras foram cultivadas em extrato de Malte suplementado com gelatina 1,0 % a 30 °C, sob agitação (140 rpm) por 72 horas. A atividade proteolítica qualitativa foi determinada em meio sólido ágar gelatina-leite e a quantitativa utilizando como substrato azocaseína 1 % p/v. Foram estabelecidas, para a espécie selecionada, as melhores condições de cultivo para produção da protease, foram estudados: características de patogenicidade, tamanho e idade do inóculo, temperatura ótima de crescimento, fontes de carbono e nitrogênio. Foram avaliadas as melhores condições de estabilidade da protease pH (6-12) e temperatura (25 °, 37 °, 40 °, 50 °, 60 °, 70 ° e 80 °C) e também, o efeito da enzima na degradação do colágeno. A determinação da atividade collagenolítica foi realizada em meio sólido utilizando colágeno solúvel como única fonte de carbono. Selecionou-se, entre as espécies identificadas, *Trichosporon pullulans* (DPUA), por apresentar o maior valor de atividade proteolítica em ensaio qualitativo (halo = 27 mm) e em ensaio quantitativo (420 U/mL). Os experimentos realizados para detectar as características de patogenicidade desta espécie demonstraram crescimento positivo a 37 °C, atividade ureásica positiva e não foi detectada atividade fosfolipásica; a maior atividade proteolítica (246,66 U/mL) foi detectada com inóculo que correspondeu a 10 % do volume de meio e cultura estoque de 24 horas de crescimento. Os ensaios realizados para verificar o efeito da temperatura no crescimento e na produção da protease demonstraram que a maior biomassa (3,46 mg/mL) e atividade proteolítica (513,33 U/mL) foram obtidas a 30 °C. A melhor fonte de carbono foi sacarose 1,0 % produzindo maior crescimento (6,18 mg/mL) e maior atividade proteolítica (580 U/mL) e como fonte de nitrogênio destacou-se a peptona 0,5 % expressando os maiores valores de atividade proteolítica (755,55 U/mL) e biomassa de 7,55 mg/mL. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a protease produzida por *T. pullulans* classifica-se como protease alcalina (pH ótimo 8,0). E maior estabilidade térmica da protease foi observada a 37 °C onde a enzima manteve 100 % de sua atividade durante 40 minutos de incubação. *T. pullulans* degradou o colágeno produzindo halo de 28 mm. Esse estudo demonstrou que a protease apresenta atividade collagenolítica e poderá ser utilizada como agente terapêutico

Palavras chaves: Proteases, Collagenases, *Trichosporon pullulans*.

## ABSTRACT

The proteases are enzymes which occupy a pivotal position with respect to their application in medical and commercial fields. Collagenases are detached among several kind of proteases, used in pharmaceutical and cosmetician industry, in processes such as smooth the skin, oral hygiene, disinfect suppurative wounds, cicatrizing processes, burning and as a trombolitic agent. In order to select protease producing yeasts, this study had as objectives to partially characterize the enzyme as for pH and stability temperature and to verify the effect of the enzyme in the degradation of collagen. 50 samples of yeasts isolated from different substrates, obtained from the culture collection DPUA, were analysed. Samples were cultured in Malte extract supplemented with 1,0 % gelatin at 30 °C in shaking conditions (140 rpm). The qualitative proteolytic activity was determined in agar gelatin-milk medium and the quantitative activity was determined using azocasein 1,0 % as substrate. The best culture conditions to protease production were established for a species, being studied the following parameters: characteristics of pathogenicity, size and age of inoculate, best growth temperature, coal and nitrogen sources. The best stability conditions of protease were assessed for pH (6-12) and temperature (25 °, 37 °, 40 °, 50 °, 60 °, 70 ° and 80 °C) and the effect of the enzyme in the degradation of collagen. Among the identified species, *Trichosporon pullulans* was selected, because it showed the highest levels of proteolytic activity in qualitative (halo = 27 mm) and quantitative (420 U/mL) assays. The assays to determine the characteristics of pathogenicity of this species showed positive growth at 37°C, weak positive ureasic activity and there was no phospholipasic activity, the highest proteolytic activity (246,66 U/mL) detected with inoculate corresponded to 10% of the volume of medium and stock of culture growth for 24 hours. Trials to verify the effect of temperature (25 °C to 50 °C) on growth and protease production demonstrated that the higher biomass (3,46 mg/mL) and proteolytic activity (513,33 U/mL) were obtained at 30 °C. Sucrose 1,0 % was the best coal source yielding higher biomass (6,18 mg/mL) and proteasic activity (580 U/mL) and as nitrogen source detached peptone 0,5 % showing the higher values of proteolytic activity (755,55 U/mL) and biomass (7,55 mg/mL). The collagenolytic activity was determined in solid medium using dissolvable collagen as the only coal source. *T. pullulans* degraded collagen, producing a 28 mm halo. This work demonstrated that protease, with collagenolytic activity; produced by *T. pullulans*, can be used as therapeutic agent further detailed studies.

Key words: Proteases, Collagenases, *Trichosporon pullulans*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição da venda de enzimas, a contribuição de diferentes enzimas no total da venda mundial (RAO *et al*, 1998) ..... 17
- Figura 2 - Ação das collagenases de origem animal x collagenases de *Clostridium* sp ..... 25
- Figura 3 - Espécies de leveduras que expressaram as maiores atividades proteolíticas em meio sólido, durante 18 horas, a 37 °C, em ágar gelatina-leite pH 5,0 ..... 42
- Figura 4 - Efeito do tamanho e idade do inóculo em diferentes meios de cultura suplementados com gelatina, na produção da protease produzida por *Trichosporon pullulans*. (A) Extrato de Malte; (B) Solução de Sais; (C) Caldo Sabouraud, todos suplementados com gelatina 1 % ..... 47
- Figura 5 - Influência da temperatura no crescimento de *Trichosporon pullulans* nos cultivos realizados em 40 mL de Extrato de Malte + gelatina 1%, sob agitação (140 rpm), em diferentes temperaturas ..... 49
- Figura 6 - Influência da temperatura na produção da protease produzida por *Trichosporon pullulans* nos cultivos realizados em 40 mL de Extrato de Malte + gelatina 1%, sob agitação (140 rpm), em diferentes temperaturas ..... 51
- Figura 7 - Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento de *Trichosporon pullulans*. GLIC.= Glicose, SAC.= Sacarose, GLIC.+ SAC.= Glicose+ Sacarose [0,5% e 1,0%] ..... 53
- Figura 8 - Influência de diferentes fontes de carbono na produção da protease de *Trichosporon pullulans*. GLIC.= Glicose, SAC.= Sacarose, GLIC.+ SAC.= Glicose + Sacarose [0,5% e 1,0%] ..... 55
- Figura 9 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de *Trichosporon pullulans*. GLIC.= Glicose, SAC.= Sacarose, GLIC.+ SAC.= Glicose + Sacarose [0,5% e 1,0%] ..... 56
- Figura 10 - Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção da protease de *Trichosporon pullulans*. S.A.= Sulfato de amônio, PEP.= Peptona, S.A.+ PEP.= Sulfato de amônio+Peptona. As concentrações utilizadas foram 0,5 % e 1,0% ..... 58
- Figura 11 - Efeito do pH na atividade proteolítica de *Trichosporon pullulans* O extrato enzimático foi analisado usando azocaseína 1 % como substrato, em tampão fosfato 0,1M (6-8) e carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M (9-12) ..... 59

Figura 12 - Termoestabilidade da protease produzida por *Trichosporon pullulans* O extrato enzimático foi analisado usando azocaseína 1% como substrato em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2 contendo 1,0 mM de CaCl<sub>2</sub>. A atividade enzimática foi determinada a cada 10 minutos ..... 61

Figura 13 - Halo de degradação do colágeno produzido por *Trichosporon pullulans*, em meio sólido e colágeno fonte de carbono ..... 62

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Leveduras isoladas de diferentes substratos do acervo da Coleção de Culturas DPUA .....	28
Tabela 2 - Frequência de espécies de leveduras representantes do gênero <i>Candida</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> e <i>Trichosporon</i> .....	40
Tabela 3 - Detecção de atividade proteolítica em espécies de leveduras, após inoculação do extrato enzimático (100µL) em meio sólido e incubação a 37 °C, por 18 horas .....	42
Tabela 4 - Atividade proteolítica de espécies de leveduras, em Extrato de Malte + gelatina 1 %, pH 6,0, a 30 °C, sob agitação (140 rpm) por 72 horas .....	44

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	14
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Potencial industrial das enzimas .....	16
2.2 Classificação das proteases .....	17
2.3 Importância das proteases produzidas por microrganismos.....	19
2.4 Leveduras .....	20
2.5 Proteases de leveduras .....	21
2.6 Colagenases .....	24
3.0 METODOLOGIA .....	28
3.1 Microrganismos e reativação das culturas .....	28
3.2 Identificação .....	29
3.3 Seleção de leveduras produtoras de proteases .....	29
3.3.1 Testes enzimáticos qualitativos .....	29
3.3.1.1 Obtenção de esporos viáveis em meio seletivo .....	29
3.3.1.2 Preparação do inóculo .....	29
3.3.2 Produção de proteases em meio líquido .....	30
3.3.2.1 Determinação da atividade proteolítica em meio sólido.....	30
3.4 Seleção da espécie de alta atividade proteolítica .....	30
3.4.1 Determinação da atividade proteásica .....	30

3.5 Caracterização da espécie selecionada .....	31
3.5.1 Análises para detecção de características de patogenicidade da espécie selecionada .....	32
3.5.1.1 Produção de fosfolipase .....	32
3.5.1.2 Produção de Urease .....	33
3.5.1.3 Crescimento a 37 °C .....	33
3.5.2 Manutenção e produção de células viáveis .....	34
3.5.3 Determinação de células viáveis em meio sólido .....	34
3.6 Análises para identificação dos fatores que influenciam na produção das da síntese das enzimas proteolíticas .....	35
3.6.1 Determinação do tamanho e idade do inóculo .....	35
3.6.1.1 Preparação do pré-inóculo .....	35
3.6.1.2 Padronização do inóculo .....	36
3.6.1.3 Determinação da temperatura ótima de crescimento .....	36
3.7 Análise das exigências nutricionais .....	37
3.7.1 Influência de fontes de carbono e de nitrogênio .....	37
3.8 Caracterização das proteases .....	38
3.8.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica .....	38
3.9 Teste de degradação do colágeno .....	38

4.0 RESULTADOS .....	40
5.0 CONCLUSÕES .....	63
REFERÊNCIAS .....	64
ANEXOS .....	68

## 1.0 INTRODUÇÃO

Enzimas microbianas têm se destacado como um dos principais produtos tecnológicos do mundo moderno. Sendo o início do século XX, marcado pela produção em larga escala, podendo citar uso na indústria de detergentes. Para fins de terapêutica, as décadas de 60 e 80 foram marcantes para uso na biotecnologia. (ZIMMER et al, 2009).

Proteases ocorrem naturalmente em todos os organismos e correspondem a 1-5% de seus conteúdos genéticos. São encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas têm despertado interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana (ZIMMER et al, 2009).

Microrganismos representam uma excelente fonte industrial para produção de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica, facilidade de manipulação genética, baixo custo na produção de metabólitos, podendo ser cultivados em grandes quantidades e em tempo relativamente curto, não sofrendo influências sazonais ou geográficas. (JING et al, 2010; VIANA et al, 2010)

Enzimas proteolíticas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e encontram aplicações em diferentes indústrias tais como detergentes, alimentícia, farmacêutica, couro, cosméticos e dermocosméticos no tratamento de caspas e acne, amaciamento da pele, higiene oral, despigmentantes, para limpar feridas infectadas, cicatrização e outras (KUMAR e TAKAGI, 1999). Essas enzimas são também utilizadas no tratamento de queimaduras, abscessos e como agente trombolítico. A grande eficiência das enzimas, aliada a sua alta especificidade, tornam-nas agentes de grande potencial para uso terapêutico, pequenas quantidades do catalisador produzem especificidade em condições fisiológicas. (SOARES et al, 1999; ZIMMER et al, 2009).

O Brasil apresenta grande potencial para a busca de novos fármacos e biomarcadores enzimáticos. O mercado externo brasileiro de enzimas foi avaliado no ano de 2005 em 147,2 milhões de dólares, correspondendo a apenas 3,7% do mercado internacional. As enzimas terapêuticas são responsáveis pela maior parte do mercado neste período, contando com uma importação de US\$ 85 milhões (AEHLE, 2007). No período de 2003 a 2005, as indústrias brasileiras que mais importaram e exportaram enzimas foram as de diagnóstico e as farmacêuticas (BON et al, 2008).

Diversas enzimas proteolíticas de origem microbiana são utilizadas como agentes terapêuticos destacando-se: Lipase de *Rhizopus arrhizus* (auxiliar digestivo), lactase de *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus oryzae* (Intolerância a lactose), amilase *Aspergillus oryzae* (auxiliar digestivo), celulase de *Trichoderma viride* (auxiliar digestivo) e Colagenase de *Clostridium histolyticum* para tratamento de úlceras de pele (ZIMMER et al, 2009). Lima et al (2009) estudaram uma cepa de *Candida albicans* produtora de colagenase com resultados promissores para a produção industrial.

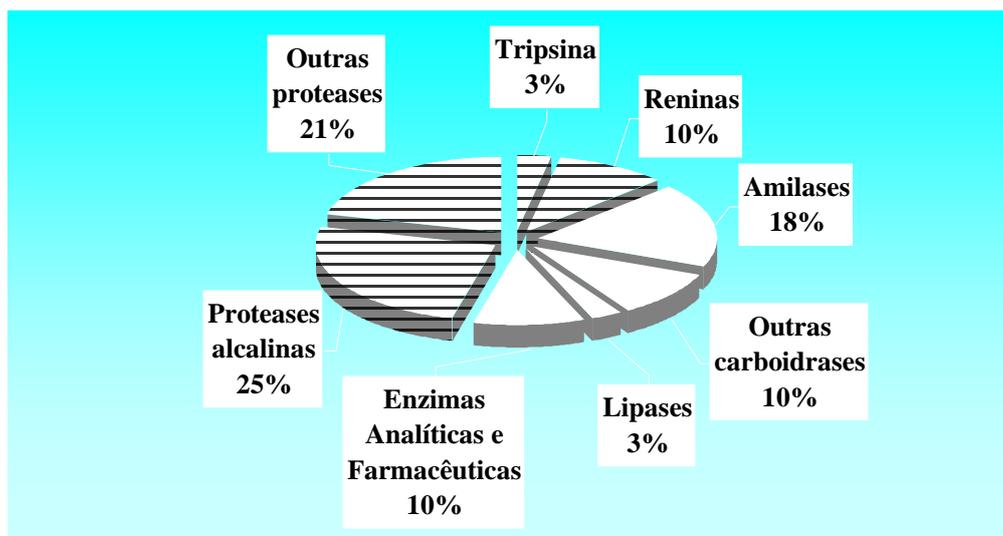
O potencial microbiológico regional, o valor econômico e a crescente aplicabilidade das enzimas na área biomédica são condições que contribuíram para realização desse estudo; como também, a escassez de estudos a cerca das proteases de origem microbiana para uso medicinal, a partir de espécies de fungos da Região Amazônica. Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar parcialmente proteases extracelulares com propriedade medicinal a partir de leveduras estocadas na Micoteca DPUA, instalada no Laboratório de Micologia da Universidade Federal do Amazonas.

## **2.0 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Potencial industrial das enzimas**

O mercado mundial de enzimas industriais está estimado em 1,5 bilhão de dólares. Desse 75 % são enzimas hidrolíticas das quais as proteases representam um dos três maiores grupos comercializadas (Figura 1). Nesse contexto Brasil participa com apenas 2,7 % da comercialização de enzimas que corresponde a 40 milhões de dólares. Nesse mercado, as proteases constituem o segundo grupo de enzimas de maior comercialização, com expressiva participação as que possuem ação terapêutica (BON e PEREIRA JÚNIOR, 1999; RAO et al, 1998; SOARES et al, 1999; ZIMMER et al, 2009).

As proteases são usadas para os mais diversos fins, contudo tem destaque na indústria de alimentos, bebidas, detergentes, couros e como agentes terapêuticos. Nos últimos anos o uso de enzimas na indústria farmacêutica e de cosmético tem expandido rapidamente. A razão para o êxito desses biocatalisadores nesse ramo industrial decorre da alta especificidade e eficiência catalítica. Assim sendo, a relevância do uso de enzimas como medicamento relaciona-se ao fato de que em pequenas quantidades a enzima pode produzir efeitos bastante específicos em condições fisiológicas de pH e temperatura (BON e PEREIRA JÚNIOR, 1999; RAO et al, 1998).



**Figura 1.** Distribuição da venda de enzimas, a contribuição de diferentes enzimas no total da venda mundial (RAO et al, 1998)

As questões ambientais, a fabricação de produtos de melhor qualidade e o controle do consumo de energia são fatores que vêm incentivando vários setores industriais a buscar tecnologias “limpas”, mais sofisticadas e de menor custo. Assim sendo, a tecnologia enzimática surgiu como alternativa para substituição gradual de processos químicos pelo uso dos biocatalisadores. Em referência ao acréscimo de biocompostos em processos industriais tem destaque a adição de proteases no beneficiamento de peles e couros, método que representa redução em 40 % na utilização de sulfetos e conseqüente liberação de efluentes nocivos para o ambiente. (BON e PEREIRA JÚNIOR, 1999; TEIXEIRA *et al*, 1994).

## 2.2 Classificação das proteases

De acordo com o Comitê Internacional de Nomenclatura “União de Bioquímica e Biologia Molecular”, proteases são hidrolases classificadas no subgrupo 4, do grupo 3 (E.C 3.4). Essas enzimas têm classificação diversificada, não obedecem facilmente as regras de nomenclatura, devido à diversidade de ação e estrutura. (RAO *et al*, 1998).

Com base no ponto de clivagem na cadeia polipeptídica as proteases ou peptidases são grosseiramente subdividas em dois grupos: **1) Exoproteases** clivam ligações peptídicas próximas as extremidades e; **2) Endoproteases** atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica. (MATSUBARA e FEDER, 1971; PRIEST, 1984; RAO *et al*, 1998). Proteases que desempenham essas atividades proporcionam, por exemplo, a formação de arginina por *Colstridium* spp (Clostripain) e prolina por *Flavobacterium* spp, peptídeos utilizados no tratamento de feridas.

De acordo com o grupo funcional presente no seu sítio catalítico as endoproteases podem ser classificadas como: serina proteases, cisteína proteases, aspárticas proteases e metaloproteases; enquanto as exoproteases são divididas com base no seu mecanismo de ação em aminoproteases e carboxiproteases. (OUTTRUP e BOYCE, 1990; PRIEST, 1984; RAO *et al*, 1998).

Outra classificação das proteases baseia-se no pH ótimo de atividade. Fundamentando-se nessa característica são classificadas como ácidas, neutras e alcalinas. As proteases ácidas têm atividade na faixa de pH 2,0 a 5,0, perdendo rapidamente a atividade em valores de pH mais elevados. São ativas na presença de agentes sulfidrílicos, agentes quelantes, metais pesados e do agente organofosfórico DFP (Diisopropil-fosfogluoridrato).

Tratando-se das proteases neutras elas têm atividade em pH entre 7,0 a 8,0, são as denominadas metaloproteases. São enzimas que necessitam de íons (Zn, Ca) para estabilidade e são inibidas por agentes quelantes como o EDTA (ácido tetracético etileno diamino).

As proteases alcalinas são ativas em pH entre 9,0 e 11,0. São inibidas por agentes organofosfóricos como DFP (Diisopropil-fosfogluoridrato) e não são inibidas por agentes quelantes. (PRIEST, 1984; RAO *et al*, 1998).

### 2.3 Importância das proteases produzidas por microrganismos

A incapacidade das enzimas de origem vegetal e animal em satisfazer a demanda mundial tem aumentado o interesse por enzimas de origem microbiana. Estes biocatalisadores são produzidos por processo de baixo custo e representam um recurso renovável, pois a biomassa resultante de determinados processos fermentativos pode ser utilizada como fertilizante (BON e PEREIRA JÚNIOR, 1999; RAO *et al*, 1998).

No âmbito comercial, as proteases produzidas por microrganismos representam 40% das enzimas vendidas mundialmente (RAO *et al*, 1998) as quais tem aplicabilidade diversificada, como auxiliares digestivos, na limpeza de fermentos, na inibição da coagulação, na terapia do câncer e no tratamento de inflamações crônicas. (BON e PEREIRA JÚNIOR, 1999; RAO *et al*, 1998; SOARES *et al*, 1999).

De acordo com Wonkeuk *et al* (1996) *Bacillus* sp sintetiza uma protease alcalina com atividade fibrinolítica, eficaz na lise de coágulos sanguíneos (fibrina) pode ser utilizada no tratamento de trombooses, como o infarto do miocárdio, que ocorre quando os coágulos não são lisados por algum problema no organismo.

Ainda com relação à importância médica das proteases, RAO *et al* (1998) descreve *Luizym* e *Nortase*, proteases sintetizadas por *Aspergillus oryzae* usadas para corrigir deficiência de enzimas líticas na digestão; proteases com atividade colagenolítica isolada de *Aspergillus niger* para fabricação de peptídeos com potencial terapêutico. E para eliminar asparagina da corrente sanguínea, em várias formas de leucemia linfocítica, já está em disponibilidade uma asparaginase isolada de *Escherichia coli*.

Comercialmente já estão disponíveis, elastoterase de *Bacillus subtilis* 316M e a colagenase de *Clostridium histolyticum* na formulação de pomadas para limpeza de feridas infectadas, tratamento de lesões purulentas e necrosadas, abscessos, escarras e queimaduras (KUMAR e TAKAGI, 1999).

As proteases destacam-se também na indústria de alimentos onde são usadas nos processos de fermentação e produção de alimentos orientais, na produção de gelatina hidrolisada e leite de soja, na clarificação de sucos para hidrolisar as proteínas que provocam turbidez e formação de sedimentos indesejáveis durante a estocagem. Na indústria de carnes são utilizadas para tenderização e condicionamento. (BOCKLE *et al*, 1995; BRAGA, 1997; OGRYDZIAK, 1993).

Outra aplicabilidade importante desta classe de enzimas é na produção de aspartame um dipeptídeo usado como adoçante. São usadas também em detergentes, na produção de papel, indústria de couros e na produção de cervejas. (BRAGA, 1997; LU e CHANG, 1996).

Várias pesquisas têm demonstrado a eficiência da aplicação industrial de proteases de microrganismos. Porém existe um impedimento para a produção da enzima desejada em grande quantidade, a repressão catabólica, na qual fontes de carbono, como a glicose, reprimem a biossíntese de várias enzimas extracelular. (FUNGARO *et al*, 1994; OUTTRUP e BOYCE, 1990; PRIEST, 1984). Uma forma de contornar este impedimento esta relacionada com a manipulação do meio de cultura. (FUNGARO *et al*, 1994; ZIMMER *et al*, 2009).

## **2.4 Leveduras**

Leveduras são fungos, predominantemente unicelulares, que se reproduzem sexuada e assexuadamente por brotamento, fissão ou cissiparidade. Microscopicamente possuem formas variadas: pseudomicélio, blastoporos, artrosporos e micélio verdadeiro. Macroscopicamente apresentam-se como colônias brilhantes ou opacas, de textura glabra ou membranosa, consistência cremosa, com ou sem pigmentação e não formam hifas aéreas. (BARNETT *et al*, 1990; TEIXEIRA *et al*, 1999).

São filogeneticamente heterogêneas pertencendo às divisões Deuteromycota (reprodução assexuada), Ascomycota e Basidiomycota (reprodução sexuada). Crescem em pH mais baixo que os valores ótimos para as bactérias. São utilizadas em processos industriais na fermentação alcoólica tradicional, na fermentação da lactose, na produção de proteína de alcanos e resíduos de polpa de papel, glicerol e como fonte de enzimas ( $\beta$ -D-fructofuranosidase,  $\beta$ -D-galactosidase e lipase) (BARNETT *et al*, 1990; LACAZ, 1984).

Para identificar as leveduras são considerados alguns critérios como: formação de pseudomicélio, micélio verdadeiro, artrósporos, assimilação de glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose e rafinose; produção de urease, compostos amilóides e de ácido acético. O estudo das características morfológicas, de reprodução e algumas características fisiológicas possibilitam a identificação em gêneros; enquanto que as características fisiológicas permitem diferenciar as espécies. (BARNETT *et al*, 1990; FISHER e COOK, 1998; TEIXEIRA *et al*, 1999).

Os recentes avanços da biologia molecular têm disponibilizado outras técnicas para a identificação de leveduras, porém, as técnicas preconizadoras que consideram as características macro e microscópicas, como o cultivo em ágar "corn meal", não podem ser descartadas servindo, assim, como base principal para a confirmação da identificação.

## **2.5 Proteases de leveduras**

Existem numerosos estudos sobre proteases produzidas por leveduras, porém a aplicação industrial deste grupo de proteases esta restrita à aplicação na coagulação do leite e para evitar turvação em cervejas e vinhos (KATUTA *et al*, 1987; MARTINI e FEDERICI, 1980; ROSI e COSTAMAGNA, 1987).

Pesquisas destinadas a aplicação médica de proteases de leveduras são carentes, no entanto, as leveduras são ótimas produtoras de proteases, sendo assim, relevantes na biotecnologia e também do ponto de vista médico. (BRAGA *et al*, 1998).

Na investigação feita por Ruchel *et al* (1986) foi realizada a purificação e caracterização de uma protease extracelular produzida por *Candida parapsilosis* em meio líquido suplementado com glicose e peptona, pH 5,2. A adição de glicerol como fonte de carbono e caseína como fonte de nitrogênio diminuiu significativamente a produção da enzima. Esses autores afirmaram que as proteases produzidas podem ser afetadas pelo pH do meio, pois, não encontraram proteases neutras ou alcalinas no sobrenadante.

Nos dados obtidos por Shimizu *et al* (1987) seis linhagens de *Candida albicans* produziram proteases ácidas em meio com sacarose como fonte de carbono e albumina de soro bovino como fonte de nitrogênio pH 3,2, porém não ocorreu a produção da enzima quando a albumina de soro bovino foi substituída por sulfato de amônio. Crandall e Edwards (1987) obtiveram resultados semelhantes segundo esses autores a adição de sulfato de amônio reprime a síntese de proteases.

Segundo Nelson e Young (1987) a composição, o pH e a temperatura do meio de crescimento, assim como, o tipo de ensaio usado influenciam diretamente a produção de proteases extracelular de leveduras. Esses autores verificaram que *Candida olea* produziu duas proteinases, uma ácida e outra alcalina. Quando a levedura foi cultivada em valores de pH 4,5 produziu proteinase ácida de peso molecular 30.900 Daltons, demonstrando atividade ótima com hemoglobina como substrato, pH 3,3 a 42 °C. Quando *C. olea* cresceu em pH 6,8 produziu uma proteinase alcalina de peso molecular 23.400 Daltons e atividade ótima com azocol como substrato e pH 8,0 a 9,0 a 40 °C.

Ogridziak (1993) descreveu a produção de proteases por diferentes espécies de leveduras. De acordo com os dados citados houve grande capacidade de leveduras

produzirem enzimas proteolíticas, a exemplo de *Bullera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Endomycopsis*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Nematospora*, *Pichia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis*, *Schwanniomyces*, *Sporodiobolus*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Yarrowia lipolytica*. Destes gêneros *Candida albicans* e *C. tropicalis* foram as espécies produtoras do maior quantitativo de proteases.

Nas análises feitas por Aoki *et al* (1994) oito linhagens de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* produziram proteinases extracelulares em meio YCB ágar (extrato de levedura 0,5%, caseína 0,5%, glicose 0,1% e ágar 2,0%) suplementado com albumina de soro bovino e polipeptona. Todas as linhagens investigadas produziram halos translúcidos ao redor dos *cup-plates*.

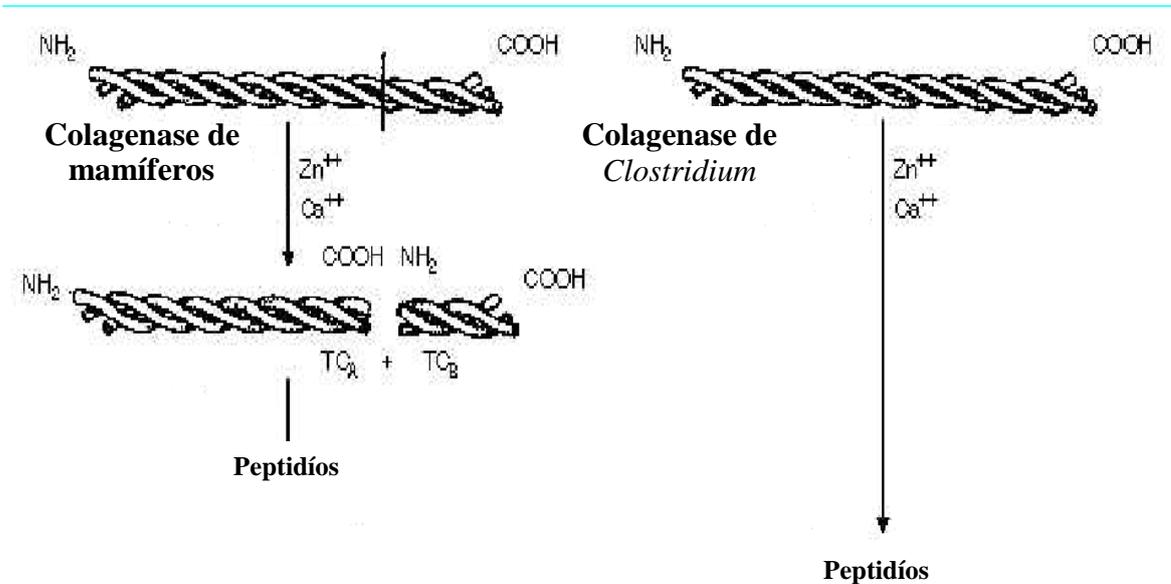
Braga (1997) e Braga *et al* (1998) testaram 88 linhagens de leveduras isoladas do fruto amazônico o amapá (*Parahancornia amapa*) quanto a capacidade de produzirem enzimas proteolíticas. Dentre estas selecionaram seis: *Candida parapsilosis* AP153A, *Candida krusei* AP176, *Candida sorbosa* DR215, *Candida sorbosa* AP259, *Candida valida* AP209A e *Candida sorbosa* AP287 por apresentarem os maiores níveis de proteases. Essas espécies foram analisadas com o objetivo de determinar as melhores condições de cultivo e produção das enzimas, pois, o estudo das características físico-químicas é de fundamental importância para aplicação industrial.

Buzzini e Martini (2002) isolaram 348 leveduras da floresta tropical brasileira. Verificaram que os gêneros mais frequentes foram: *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Hansenula* e *Saccharomyces*. Nesses estudos foi feita investigação quanto à capacidade desses microrganismos produzirem enzimas extracelulares (proteases, amilases, lipases, pectinases e quitinases). Os autores concluíram que leveduras são fontes promissoras de enzimas extracelulares sendo, assim, importantes em processos industriais.

## 2.6 Colagenases

Existe um grande interesse na busca de colagenases de outras fontes que não animal, pois, esta possui a capacidade de clivar somente o colágeno nativo, isto é, são enzimas que clivam a cadeia helicoidal do colágeno resultando em dois fragmentos (Figura 2), acessíveis a poucas proteases específicas, o TCA (tropocolágeno A) e o TCB (tropocolágeno B). Diferente das anteriores, as colagenases de microrganismos possuem a capacidade de hidrolisar tanto o colágeno nativo como o colágeno desnaturado. Têm afinidade por vários sítios ao longo da cadeia, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (JUNG *et al*, 1998).

A eficácia do uso de colagenases de microrganismo como agentes terapêuticos têm sido relatada em vários artigos onde são utilizadas para no tratamento de caspas e acnes, amaciamento da pele, higiene oral, para limpar feridas infectadas, cicatrização, no tratamento de queimaduras e abscessos e como agente trombolítico. (BENITO *et al*, 2002; JUNG *et al*, 1998; LUND e GRANUM, 1999; MOOKHTIAR e VAN WART, 1992; MATSUSHITA *et al*, 1994; WATANABE, 2004)



**Figura 2.** Ação das colagenases de origem animal x colagenases de *Clostridium* sp

Entre as colagenases obtidas de microrganismos destaca-se a de *Clostridium histolyticum* que é usada em associação com antibióticos, para limpeza de queimaduras e feridas infectadas removendo o tecido necrosado. (RAO *et al*, 1998).

Segundo Jung *et al* (1998) existem inúmeras vantagens do uso de colagenases de microrganismo no tratamento de feridas: a) Removem o tecido necrosado com maior eficiência por sua capacidade de hidolisar vários tipos de colágeno; b) são indolores e não hemorrágicas; c) podem ser usados por longos períodos e também em associação com outros medicamentos; d) atraem macrófagos e fibroblastos para o local da ferida; e) aumentam a formação de tecidos de granulação e estimulam o próprio corpo a promover a cicatrização.

Cheng *et al* (1999) investigaram o mecanismo de degradação do colágeno em cicatrizes hipertróficas. Testaram a eficácia das colagenases de bactérias em ratos e clinicamente, em 13 pacientes. O experimento foi conduzido utilizando-se injeções de colagenases diretamente sobre as cicatrizes hipertróficas, nos ratos obtiveram 86% de redução do volume da cicatriz e 46,92% nos pacientes. Em 4 dos 13 casos a redução foi

maior que 50%, apenas um entre os 13 pacientes apresentou reaparecimento da cicatriz após o tratamento. Exames histológicos mostraram claramente a dissolução das fibras de colágeno.

As colagenases de microrganismos estão sendo largamente usadas na medicina com o propósito de limpar feridas infectadas e/ou necrosadas, queimaduras, escarras, cicatrizes pós-operatórias, no tratamento de pisoríase e pediculoses (BATURIN *et al*, 2003; MARKOVICH, 2003).

Uma outra aplicação é em terapias trombolíticas onde estão sendo utilizadas como fonte ativadora do plasminogênio; no tratamento de diabetes são usadas para estimular a produção de células viáveis de Langerhance, células de Langerhance iniciais, em animais, a síntese de insulina. O Instituto de Transplantes da Academia de Ciências Médicas (Transplantology Institute of the Academy of Medical Sciences – Moscow) estão utilizando esta nova técnica (DETSINA, 2003).

Na indústria de cosméticos as colagenases estão sendo utilizadas no preparo de cremes para o tratamento de acne e rugas, limpeza e clareamento da pele e para suavizar cicatrizes de quelóides (DETSINA, 2003; DOMOGATSKY, 2003).

Colagenases de microrganismos são também utilizadas na indústria de alimentos para o amaciamento de carne e para limpeza de mariscos (TRAN e NAGANO, 2002). Neste contexto Benito *et al* (2002) investigaram a ação de uma colagenase de *Penicillium chrysogenum* no tratamento de carnes e observaram melhor sabor e textura.

Uma nova colagenase isolada de um actinomiceto não patogênico está sendo testada pelos Institute of Biological Medicine, Cardiological Center of the Academy of Medical Sciences, the Vishnevskiy Surgery Institute, Diabetes Institute e a Factory of Theater Cosmetics (Moscow), o interesse destes Centros de Pesquisa nesta enzima deve-se ao fato que a metodologia utilizada para sua obtenção é mais fácil e barata comparando-se

a metodologia utilizada para a obtenção da colagenase de *Clostridium* sp (SIGMA). Os testes demonstraram sua eficácia e não toxicidade. A referida enzima já que se encontra em processo de patenteamento (BATURIN *et al*, 2003; MARKOVICH, 2003).

O Centro de Pesquisa em Cardiologia da Rússia (The Russian Cardiology Research Center) vem desenvolvendo estudos com proteases com atividade colagenolítica de *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *Streptomyces* sp e *Aspergillus niger* para serem utilizadas no tratamento de queimaduras de terceiro grau. E estudos utilizando animais demonstraram o efeito não tóxico, baixa irritação e um processo de cicatrização duas vezes mais rápido que os observados em feridas não tratadas com estas enzimas (DOMOGATSKY, 2003).

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Microrganismos e reativação das culturas

Neste estudo foram analisadas 50 culturas de leveduras, selecionadas aleatoriamente, (Tabela 1) provenientes do acervo da Coleção de Culturas DPUA (Departamento de Parasitologia da Universidade Federal do Amazonas). Para reativação das culturas preservadas foi transferido um fragmento da colônia para ágar Malte, inclinado. Os cultivos preparados em tubo de ensaio de 19,8 x 1,8 mm foram mantidos a 30 °C, por 72 horas para posterior identificação das diferentes espécies.

Leveduras	Substrato de isolamento	Leveduras	Substrato de isolamento
<i>Candida</i>	Pele	<i>Candida</i>	Castanha
<i>Candida</i>	Pele	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Tecido de peixe	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Unha	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Unha	<i>Candida</i>	castanha
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Pele	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Pele	<i>Candida</i>	Unha
<i>Candida</i>	Tecido de peixe	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Candida</i>	Unha
<i>Candida</i>	Unha	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Castanha	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Tecido de peixe	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Candida</i>	Pele
<i>Candida</i>	Pele	<i>Candida</i>	Unha
<i>Candida</i>	Pele	<i>Rhodotorula</i>	Cupuaçu
<i>Candida</i>	Pele	<i>Rhodotorula</i>	Castanha
<i>Candida</i>	Unha	<i>Rhodotorula</i>	Castanha
<i>Candida</i>	Cupuaçu	<i>Saccharomyces</i>	Castanha
<i>Candida</i>	Castanha	<i>Saccharomyces</i>	Castanha
<i>Candida</i>	Castanha	<i>Trichosporon</i>	Tecido de peixe
<i>Candida</i>	Pele	<i>Trichosporon</i>	Tecido de peixe
<i>Candida</i>	Pele	<i>Trichosporon</i>	Unha

**Tabela 1:** Leveduras isoladas de diferentes substratos do acervo da Coleção de Culturas DPUA

#### 3.2 Identificação

A identificação das leveduras em nível de espécie foi baseada nas técnicas preconizada de Kreger Van Rij (1984), Lodder (1984), Barnett *et al* (1990), Fisher e Cook (1998). As amostras não identificadas pelas técnicas convencionais foram analisadas no Kit api 20C AUX (BioMérieux) que se fundamenta na assimilação de 18 fontes de carbono. Para firmar o diagnóstico específico foi realizada a análise das características micromorfológicas das estruturas obtidas nos microcultivos preparados em ágar "corn meal" (TEIXEIRA *et al*, 1992). Para evidenciação dos ascos e ascosporos foi usada a técnica de Wirtz, segundo Lacaz (1984).

### **3.3 Seleção de leveduras produtoras proteases**

As leveduras identificadas (item 3.2) foram submetidas à análise enzimática para selecionar uma espécie produtora de altos níveis de protease. Para detectar a atividade proteolítica foram realizados os ensaios descritos a seguir.

#### **3.3.1 Testes enzimáticos qualitativos**

##### **3.3.1.1 Obtenção de esporos viáveis em meio seletivo**

As leveduras foram cultivadas em ágar malte durante 72 horas e mantidas a 30 °C para posterior cultivo em extrato de malte, suplementado com gelatina 1 %.

##### **3.3.1.2 Preparação do inóculo**

Das culturas obtidas no item 3.3.1.1 foi retirada uma alíquota com alça de inoculação (extremidade medindo 5 mm) em 5 mL de água destilada esterilizada em tubo de ensaio de 14,8 mm X 23,0 mm. O preparado foi agitado em Vortex para homogeneização. A suspensão foi padronizada pela escala de MacFarland 3 (BECKER *et al*, 1996).

### 3.3.2 Produção de proteases em meio líquido

Da suspensão celular obtida no item 3.3.1.2 retirou-se 1000  $\mu\text{L}$  para Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de Extrato de Malte, adicionado de gelatina 1 %, pH 6,0. Os cultivos, em triplicata, foram mantidos a 30 °C, sob agitação (140 rpm). Após 72 horas, separou-se a biomassa do extrato enzimático por centrifugação (12.000g/5 min.) (BARNETT et al, 1990; PORTO et al, 1996).

#### 3.3.2.1 Determinação da atividade proteolítica em meio sólido

Para determinação da atividade enzimática qualitativa foi utilizado o meio de cultura ágar-gelatina-leite descrito por Teixeira *et al* (1996). O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 15 mm x 100 mm, formando uma camada de 4 mm. Após solidificação à temperatura ambiente (25 °C), as placas foram armazenadas sob refrigeração (4 °C), por uma hora.

Após total solidificação do meio foram feitos *cup-plates* na superfície do ágar, com um tubo de vidro oco. Cada *cup-plate* de 8 mm de diâmetro foi preenchido com 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (item 3.3.2 ) e incubados a 37° C durante 18 horas (TEIXEIRA, 1997)

A observação da reação enzimática positiva foi visualizada com a formação de halos translúcidos em torno dos *cup-plates*. Para evitar a evaporação do filtrado da cultura, as placas foram protegidas com papel alumínio durante a permanência em estufa microbiológica. A atividade enzimática foi determinada pelo tamanho do halo em milímetros, medindo-se o diâmetro do halo pelo reverso da placa de Petri (TEIXEIRA et al, 1996; TEIXEIRA, 1997).

### 3.4 Seleção da espécie de alta atividade proteolítica

Para selecionar a espécie produtora de altos níveis de protease, os extratos enzimáticos do item 3.3.2 foram submetidos à análise enzimática de acordo com o método citado a seguir.

#### 3.4.1 Determinação da atividade proteásica

O extrato enzimático (item 3.3.2) foi submetido à análise quantitativa, utilizando-se como substrato, azocaseína 1,0 % (p/v) (Sigma, St. Louis, MOUSA) em tampão Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2 contendo 1,0 mM de  $\text{CaCl}_2$  (PORTO *et al*, 1996).

A reação foi formulada com 250  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1 % e 150  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. O preparado foi incubado por 1 hora a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 1,2 mL de ácido tricloroacético 10 % (p/v), deixando-se por 15 minutos incubado a 4 °C para total precipitação do substrato que não foi degradado. O substrato remanescente foi removido por centrifugação a 12.000 g/5 minutos. Do sobrenadante foi retirado 1,2 mL e misturado com 1,4 mL de NaOH 1M. Todas as análises foram realizadas em triplicata. O branco foi preparado e mantido nas mesmas condições de análise das amostras. (LEIGHTON *et al*, 1973; DOSORETZ *et al*, 1990; PORTO *et al*, 1996).

Uma unidade de atividade proteásica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001 em uma hora a 440nm.

### 3.5 Caracterização da espécie selecionada

Posterior a seleção de *Trichosporon pullulans* como a espécie de maior atividade proteolítica todos os experimentos citados a seguir foram realizados com essa espécie.

#### 3.5.1 Análises para detecção de características de patogenicidade da espécie selecionada

Na escolha de fonte microbiana para produção de compostos ou para utilização em processos na indústria de alimentos ou medicamentos exige-se que este não seja patogênico, não produza micotoxinas ou outras substâncias tóxicas (FUNGARO *et al*, 1994). Assim sendo foram consideradas as seguintes características de patogenicidade: atividade fosfolipásica, ureásica e crescimento a 37 °C, pois, atuam diretamente como fator de virulência devido ao envolvimento com a propagação do microrganismo no hospedeiro (NUNES, 1998).

##### 3.5.1.1 Produção de fosfolipase

A atividade fosfolipásica foi detectada utilizando-se como substrato gema de ovo. Os cultivos foram preparados em placa de Petri de 15 x 100 mm, em triplicata, os quais foram mantidos a 25 °C, observando-se a cada 24 horas, durante 7 dias. A atividade fosfolipásica foi determinada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Equação 1 } P_z = \frac{\varnothing \text{ da col\^onia}}{\varnothing \text{ da col\^onia} + \text{zona de precipita\c{c}\~ao}}$$

Onde,

$P_z$  = Atividade fosfolipásica

$P_z = 1$ , atividade fosfolipásica negativa;

$P_z < 1$ , atividade fosfolipásica positiva;

$\varnothing$  = diâmetro da colônia

Zona de precipitação = halo formado

### 3.5.1.2 Produção de Urease

Para detecção da atividade ureásica, os cultivos foram inoculados, em triplicata, em meio ágar Uréia (meio de Christensen) contido em tubos de ensaio de 19,8 x 1,8 mm. Os cultivos foram mantidos a 25 °C e observados entre 24 e 72 horas. A atividade ureásica foi determinada pela mudança de cor no meio: 1) Positiva forte - mudança total da cor do meio de amarelo para rosa-fúccia intensa; 2) Positiva fraca - mudança parcial da cor do meio; 3) Negativa - quando a cor amarela do meio foi mantida.

### 3.5.1.3 Crescimento a 37 °C

A determinação do crescimento a 37 °C foi realizada em ágar Malte acondicionado em tubos de ensaio de 19,8 x 1,8 mm. Os cultivos, em triplicata, foram mantidos a 37 °C observando-se o crescimento do microrganismo a cada 24 horas, durante 7 dias.

### 3.5.2 Cultivo monospórico

A espécie selecionada foi submetida a cultivo monospórico, procedimento que visa diminuir a variabilidade genética. Esta técnica consiste em semear na superfície de ágar

Água 1,8 % uma alíquota (200 µL) da suspensão de esporos preparada em água destilada esterilizada e de concentração conhecida (três esporos em 10 µL da suspensão). Os cultivos preparados em placa de Petri (15 x 100 mm) foram mantidos a 30 °C entre 24 horas a 48 horas. Durante este período de incubação foi separado um esporo para ser semeado na superfície de em ágar Malte em tubo de ensaio de 19,8 x 1,8 mm com (TEIXEIRA *et al*, 1999).

### 3.5.3 Manutenção e produção de células viáveis

Para manutenção de cultura pura e produção de células viáveis, fragmentos de cultura monospórica foram transferidos para ágar Sabouraud e ágar Malte. Os cultivos em tubo de ensaio (19,8 x 1,8 mm) foram mantidos a 30 °C durante 24 horas.

### 3.5.4 Determinação de células viáveis em meio sólido

A viabilidade das culturas (item 3.5.3) foi identificada determinando-se o número de células viáveis associado ao número de unidades formadoras de colônias (UFC). Para obtenção dos cultivos foram preparadas diluições decimais sucessivas. Da última diluição (diluição  $10^{-6}$ ) foi retirado 1000 µL para ser incorporado em placa de Petri (15 x 100 mm) contendo ágar Sabouraud e ágar Malte (BROCK *et al*, 1994). As placas foram observadas a cada 24 horas, durante 72 horas, para acompanhar o crescimento das colônias.

### **3.6 Análises para identificação dos fatores que influenciam na síntese das enzimas proteolíticas**

Para identificar as melhores condições de cultivo para o crescimento da levedura selecionada e produção de proteases foram realizadas as análises detalhadas a seguir.

#### **3.6.1 Determinação do tamanho e idade do inóculo**

Nos processos fermentativos a determinação do tamanho do inóculo auxilia a identificação do quantitativo de célula adequado para que durante o crescimento do microrganismo a fase *Lag* (fase de adaptação) seja reduzida. Associado a este fator tem destaque a análise dos critérios nutricionais que proporcionam a máxima produção de biocompostos. (BECKER *et al*, 1996; STANBURY e WHITAKER, 1984; RHODES e STANBURY, 1997).

##### **3.6.1.1 Preparação do pré-inóculo**

Para determinação do tamanho e idade do inóculo da espécie selecionada foi preparado o pré-inóculo a partir de culturas-estoque obtidas a 30 °C, durante 24 e 72 horas, em ágar Malte e ágar Sabouraud, inclinado. Nesses cultivos em meio sólido foi adicionado água destilada esterilizada até obtenção de uma suspensão de esporos semelhante a concentração da Escala de MacFarland 3.

O pré-inóculo foi preparado transferindo-se alíquotas da suspensão de esporos para que se obtivesse a respectiva concentração: 3 %, 5 %, 8 % e 10 % (v/v) do volume do meio. Os Erlenmeyers de 50 mL contendo o volume final de 10 mL de meio líquido foram mantidos a 30 °C, sob agitação (140 rpm) por 24 horas. Para obtenção do pré-inóculo os

meios utilizados foram: Extrato de Malte, caldo Sabouraud e solução de sais adicionados de gelatina 1% (GARCIA-GARIBAY et al, 1987; NAMPOOTHIRI e PANDEY, 1995; STANBURY e WHITAKER, 1984).

### 3.6.1.2 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi feita a partir dos pré-inóculos obtidos no item 3.6.1.1. Cada pré-inóculo, nas diferentes concentrações foi transferindo, respectivamente para Extrato de Malte, caldo Sabouraud e Solução de sais em Erlenmeyers de 125 mL, obtendo-se um volume final de 40 mL de meio.

Os inóculos, em triplicata, foram incubados a 30 °C e mantidos sob agitação (140 rpm) por 72 horas. Ao término do processo de fermentação a biomassa foi separada do extrato enzimático por centrifugação de acordo com a metodologia recomendada por Porto *et al* (1996). E a atividade enzimática foi determinada (item 3.4.1).

### 3.6.1.3 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Para se classificar *Trichosporon pullulans* quanto à temperatura e avaliar a produção de protease durante o crescimento foram realizados cultivos detalhados a seguir.

Para obtenção dos cultivos a 25 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C foi adicionado o inóculo padronizado no item 3.6.1.2 em Erlenmeyers de 125 mL obtendo-se um volume final de 40 mL do meio de fermentação. Os cultivos em triplicata foram mantidos sob agitação (140 rpm).

O crescimento de *Trichosporon pullulans* foi avaliado determinando-se o peso da biomassa desidratada a 80 °C, utilizando-se papel de filtro INLAB tipo 30. O peso da

matéria seca foi determinado a cada 12 horas, durante 72 horas. A atividade enzimática foi determinada a cada 12 horas como no item 3.4.1.

### 3.7 Análise das exigências nutricionais

Considerando que os fungos, como os demais microrganismos exigem fontes de carbono, nitrogênio e íons orgânicos para crescimento e produção de metabólitos primários e secundários, a partir desta etapa os ensaios foram realizados com a finalidade de se conhecer as exigências nutricionais de *Trichosporon pullulans* e determinar condições que proporcionem produção de proteases em maior quantitativo (KUMAR e TAKAGI, 1999; RHODES e STANBURY, 1997),.

#### 3.7.1 Influência de fontes de carbono e de nitrogênio

Com o objetivo de avaliar a influência diferentes fontes de carbono e nitrogênio no crescimento e na produção das proteases por *Trichosporon pullulans* foram analisadas como fontes de carbono - sacarose e glicose e fontes de nitrogênio - sulfato de amônio e peptona a 0,5 % e 1,0 %, respectivamente. Os cultivos, em triplicata, foram preparados em Erlenmeyers de 125mL com 40mL de volume final de meio e mantidos a 30 °C, sob agitação (140 rpm), por 72 horas. (SOARES, 2001). O experimento foi realizado a partir de culturas padronizadas no item 3.6.1.2. A influência de fontes de carbono e nitrogênio no crescimento da levedura foi verificada através do peso seco da biomassa (item 3.6.1.3). A atividade enzimática foi determinada a cada 12 horas (item 3.4.1).

### 3.8 Caracterização das proteases

#### 3.8.1 Efeito da temperatura e do pH na atividade proteolítica

O efeito do pH na atividade proteolítica foi avaliado utilizando-se os tampões: Fosfato 0,1M (6-8) e Carbonato-bicarbonato 0,1M (9-12) (GOMORI, 1955; MOREIRA *et al*, 2002; PETINATE *et al*, 1999). Para cada faixa de pH a atividade enzimática foi determinada como no item 3.4.1.

A influência da temperatura na atividade proteolítica foi realizada utilizando-se o extrato enzimático incubado-o nas temperaturas de 25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C. O tempo de incubação das amostras foi de 0 a 90 minutos para cada temperatura, determinando-se atividade enzimática a cada 10 minutos conforme citado no item 3.4.1 (MOREIRA *et al*, 2002).

### 3.9 Teste de degradação do colágeno

Para determinação da atividade colagenolítica foi utilizado o meio de cultura Ágar-Gelatina-leite descrita por Teixeira *et al* (1996) modificado, sendo colágeno solúvel a única fonte de carbono. O meio de cultura foi distribuído em placas de Petri de 15 x 100 mm. Foram feitos *cup-plates* na superfície do ágar-Colágeno com um tubo de vidro oco de 8 mm de diâmetro. Nesses *cup-plates* foram adicionados 100 µL do centrifugado das culturas e incubados a 37 °C durante 18 horas.

A observação da reação enzimática positiva foi visualizada com a formação de halos translúcidos em torno dos *cup-plates*. Para evitar a evaporação do filtrado da cultura, as placas foram protegidas com papel alumínio durante a permanência em estufa microbiológica.

Este teste foi realizado para verificar se a levedura selecionada produz proteases com atividade colagenolítica, pois estas enzimas estão sendo pesquisadas para aplicação médica e farmacêutica.

#### 4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificados, em nível específico, 50 leveduras, pertencentes aos gêneros *Candida* (78,6 %), *Rhodotorula* (7,1 %), *Saccharomyces* (3,6 %) *Trichosporon* (10,7 %), observando-se a predominância do gênero *Candida*. Entre as espécies de *Candida*, *Candida aquatica* (12 %) e *Candida albicans* (10 %) foram as de maior frequência (Tabela 2).

ESPÉCIES	Nº	(%)	ESPÉCIES	Nº	(%)
<i>Candida albicans</i> (Robin Berkhout)	5	10	<i>Candida intermedia</i> Langergon e Guerra	3	6
<i>Candida aaseri</i> Van Uden e Buckley (Lodder)	1	2	<i>Candida martinie</i> (Lodder)	1	2
<i>Candida aquatica</i> (Lodder)	6	12	<i>Candida mellini</i> (Lodder)	1	2
<i>Candida bertae</i> Ramirez e González	2	4	<i>Candida paludigena</i> (Golubev et al)	1	2
<i>Candida blankii</i> Buckley e Van Uden	3	6	<i>Candida pediculosa</i> (Kern et al)	2	4
<i>Candida buinensis</i> Soneda e Uchida	2	4	<i>Candida tenuis</i> Diddens e Lodder	1	2
<i>Candida cantarelli</i> Meyer e Yarrow	1	2	<i>Candida valdiviana</i> Grinbers e Yarrow	1	2
<i>Candida cefferi</i> Cefferi e Ashford	1	2	<i>Candida vartiovaarai</i> Van Uden e Buckley	3	6
<i>Candida dendronema</i> Van der Walt et al	1	2	<i>Rhodotorula minuta</i> Harrison	1	2
<i>Candida entomophila</i> Scott et al (Van der Walt)	1	2	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> Jorgensen e Harrison	2	4
<i>Candida etchellsii</i> (Lodder)	2	4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Meyers ex Hansen	2	4
<i>Candida guilhermondi</i> (Kern et al)	2	4	<i>Trichosporon adeninovorans</i> Middelhoven et al	1	2
<i>Candida halophila</i> Yarrow e Mey	1	2	<i>Trichosporon aquatile</i> Hedrick e Dupont	1	2
<i>Candida ishiwadae</i> Sugiyana e Goto	1	2	<i>Trichosporon pullulans</i> Diddens e Lodder	1	2
TOTAL 50					

**Tabela 2.** Frequência de espécies de leveduras representantes do gênero *Candida*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces* e *Trichosporon*

Esses resultados estão de acordo com citados na literatura (BARNETT et al, 1990; BARNETT et al 2000; FISHER e COOK, 1998), onde se observa a predominância das espécies de *Candida* devido ao fato destas serem parte tanto da microbiota animal quanto da vegetal. Neves et al (2006) identificaram os seguintes generos *Candida*, *Cryptococcus*, *Dekkera*, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e

*Trichosporon*, entre estas, as de maior frequência foram *Candida aquatica* (12 %) e *Candida tropicalis* (10 %).

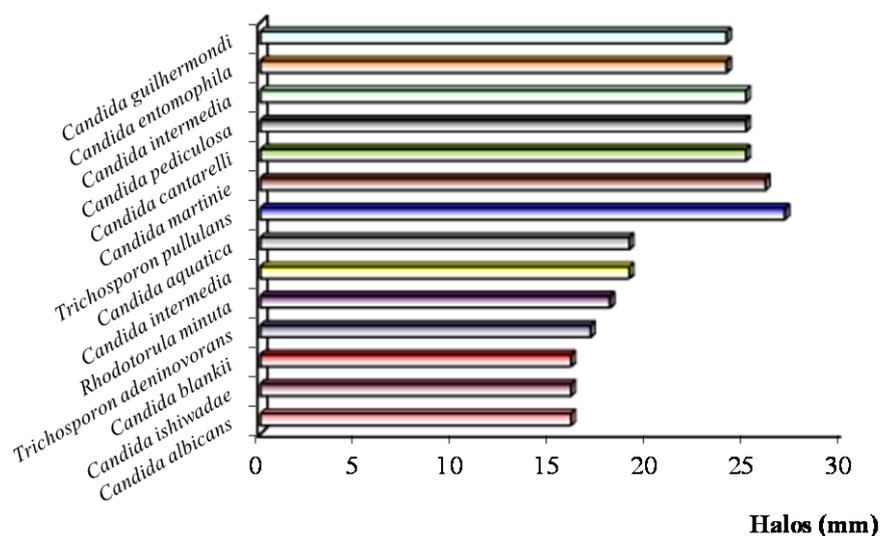
Proteases são enzimas produzidas tanto por fungos filamentosos quanto por leveduras em diferentes condições de fermentação e amplamente utilizadas em diferentes atividades industriais.

Os resultados obtidos relativos à atividade proteolítica demonstraram que 94 % das 50 leveduras analisadas expressaram reação positiva, como citado na tabela 3. Entre esses microrganismos, em média, a magnitude do diâmetro do halo correspondeu a 14,6 mm.

Entre as 28 espécies, representantes das 50 leveduras identificadas, os dados mostraram que os níveis proteolíticos foram diferenciados: 28 % expressaram halos entre 16 mm a 27 mm, em 66 % o diâmetro do halo variou de 10 mm a 15 mm e somente 6 % das espécies demonstraram reação negativa (Tabela 3). Nessas condições analíticas *Trichosporon pullulnas* e *Candida martinie* foram às espécies que demonstraram a maior atividade proteolítica 27 e 26 mm, respectivamente (Figura 3).

Espécies	Atividade proteásica (Halos em mm)	Espécies	Atividade proteásica (Halos em mm)
<i>Candida albicans</i>	15	<i>Candida guilhermondi</i>	24
<i>Candida albicans</i>	16	<i>Candida guilhermondi</i>	12
<i>Candida albicans</i>	13	<i>Candida halophila</i>	-
<i>Candida albicans</i>	12	<i>Candida ishiwadae</i>	16
<i>Candida albicans</i>	14	<i>Candida intermedia</i>	25
<i>Candida aaseri</i>	13	<i>Candida intermedia</i>	19
<i>Candida aquatica</i>	10	<i>Candida intermedia</i>	15
<i>Candida aquatica</i>	10	<i>Candida martinie</i>	26
<i>Candida aquatica</i>	10	<i>Candida mellini</i>	12
<i>Candida aquatica</i>	10	<i>Candida paulidigena</i>	10
<i>Candida aquatica</i>	15	<i>Candida pediculosa</i>	25
<i>Candida aquatica</i>	19	<i>Candida pediculosa</i>	12
<i>Candida bertae</i>	10	<i>Candida tenuis</i>	12
<i>Candida bertae</i>	12	<i>Candida valdiviana</i>	13
<i>Candida blankii</i>	12	<i>Candida vartiovaarai</i>	10
<i>Candida blankii</i>	16	<i>Candida vartiovaarai</i>	14
<i>Candida blankii</i>	13	<i>Candida vartiovaarai</i>	11
<i>Candida buinensis</i>	15	<i>Rhodotorula minuta</i>	18
<i>Candida buinensis</i>	13	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	12
<i>Candida cantarelli</i>	25	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10
<i>Candida cefferi</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
<i>Candida dendronema</i>	-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
<i>Candida entomophila</i>	24	<i>Trichosporon adeninovorans</i>	17
<i>Candida etchellsii</i>	13	<i>Trichosporon aquatile</i>	15
<i>Candida etchellsii</i>	14	<i>Trichosporon pullulans</i>	27

**Tabela 3.** Detecção de atividade proteolítica em espécies de leveduras, após inoculação do extrato enzimático (100µL) em meio sólido e incubação a 37 °C, por 18 horas



**Figura 3.** Espécies de leveduras que expressaram as maiores atividades proteolíticas em meio sólido, durante 18 horas, a 37 °C, em Ágar gelatina-leite pH 5,0

PICHOVA *et al* (2001) analisaram leveduras fazendo referencia a produção de proteases extracelular por *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. lusitaniae*. Em outros estudos, NEVES *et al* (2006) ao analisarem 50 linhagens de leveduras proteolíticas, selecionaram como maior produtora *Candida intermedia*. De acordo com tais resultados pode-se inferir que leveduras podem ser fontes promissoras de proteases extracelulares.

O método qualitativo para detecção da atividade proteolítica oferece muitas vantagens como, melhor evidenciação da zona de reação, exclusão do crescimento celular na superfície do meio (TEIXEIRA *et al*, 1996; VERMELHO *et al*, 1996). Porém este método se baseia apenas em detectar se o microrganismo produz ou não a enzima. Fundamentando-se nessa conclusão, as amostras de leveduras foram submetidas à análise quantitativa para selecionar a espécie de maior atividade proteolítica.

Os dados da tabela 4 comprovaram os resultados obtidos em meio sólido, das 50 amostras de leveduras 94 % expressaram atividade proteásica positiva e somente 3 (6 %) não produziram proteases. Nestas análises *Trichosporon pullulans* produziu os maiores níveis de atividade proteásica 420 U/mL enquanto que *Candida martinie* apenas 120 U/mL (Tabela 4). Conforme esses dados, a atividade proteolítica expressada por *Trichosporon pullulans* foi 71,43 % superior a de *Candida martinie*. Esses resultados foram similares aos encontrados por Ray *et al* (1992) quando analisaram *Cryptococcus albidus* e *Candida albicans*, em diferentes condições de fermentação e Neves *et al* (2006) analisando diferentes espécies de *Candida*.

Espécies	Atividade proteásica (U/mL)	Espécies	Atividade proteásica (U/mL)
<i>Candida albicans</i>	133,33 ± 0,00	<i>Candida guilhermondi</i>	186,66 ± 0,00
<i>Candida albicans</i>	171,11 ± 0,19	<i>Candida guilhermondi</i>	166,66 ± 0,00
<i>Candida albicans</i>	180,00 ± 0,00	<i>Candida halophila</i>	0,00 ± 0,00
<i>Candida albicans</i>	223,33 ± 0,00	<i>Candida ishiwadae</i>	164,44 ± 0,38
<i>Candida albicans</i>	126,66 ± 0,00	<i>Candida intermedia</i>	266,66 ± 0,00
<i>Candida aaseri</i>	120,00 ± 0,00	<i>Candida intermedia</i>	226,66 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	120,00 ± 0,00	<i>Candida intermedia</i>	306,66 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	120,33 ± 0,58	<i>Candida martinie</i>	120,00 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	179,66 ± 0,58	<i>Candida mellini</i>	173,33 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	258,33 ± 0,57	<i>Candida paulidigena</i>	133,33 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	181,00 ± 0,00	<i>Candida pediculosa</i>	120,00 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	166,66 ± 0,38	<i>Candida pediculosa</i>	120,22 ± 0,19
<i>Candida bertae</i>	140,00 ± 0,00	<i>Candida tenuis</i>	126,66 ± 0,00
<i>Candida bertae</i>	159,87 ± 0,21	<i>Candida valdiviana</i>	153,33 ± 0,00
<i>Candida blankii</i>	153,33 ± 0,00	<i>Candida vartiovaarai</i>	153,33 ± 0,00
<i>Candida blankii</i>	193,33 ± 0,00	<i>Candida vartiovaarai</i>	140,00 ± 0,00
<i>Candida blankii</i>	113,33 ± 0,00	<i>Candida vartiovaarai</i>	120,00 ± 0,00
<i>Candida buinensis</i>	153,33 ± 0,00	<i>Rhodotorula mi,nuta</i>	165,33 ± 0,58
<i>Candida buinensis</i>	146,64 ± 0,03	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	120,00 ± 0,00
<i>Candida cantarelli</i>	133,00 ± 0,58	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	126,66 ± 0,00
<i>Candida cefferi</i>	0,00 ± 0,00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119,66 ± 0,58
<i>Candida dendronema</i>	0,00 ± 0,00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	140,00 ± 0,00
<i>Candida entomophila</i>	106,66 ± 0,00	<i>Trichosporon adeninovorans</i>	260,00 ± 0,00
<i>Candida etchellsii</i>	113,33 ± 0,00	<i>Trichosporon aquatile</i>	140,00 ± 0,00
<i>Candida etchellsii</i>	166,66 ± 0,00	<i>Trichosporon pullulans</i>	420,00 ± 0,00

**Tabela 4.** Atividade proteolítica de espécies de leveduras, em Extrato de Malte + gelatina 1 %, pH 6,0, a 30 °C, sob agitação (140 rpm) por 72 horas

As análises realizadas para detectar fatores de patogenicidade de *Trichosporon pullulans* observou-se o crescimento positivo a 37 °C e atividade ureásica positiva fraca e não foi detectada atividade fosfolipásica. Os resultados obtidos neste estudo não são suficientes para classificar *Trichosporon pullulans* como patogênico, pois a habilidade de produzir fatores patogênicos é variável entre linhagens, fatores isolados não podem determinar a virulência de qualquer espécie fúngica. O mecanismo de patogênese dos fungos envolve muitos fatores, entre os quais podem ser citados a capacidade de adesão celular, produção de fosfolipase, urease, crescimento a 37 °C e a adaptação morfológica às condições do hospedeiro (NEVES et al, 2006).

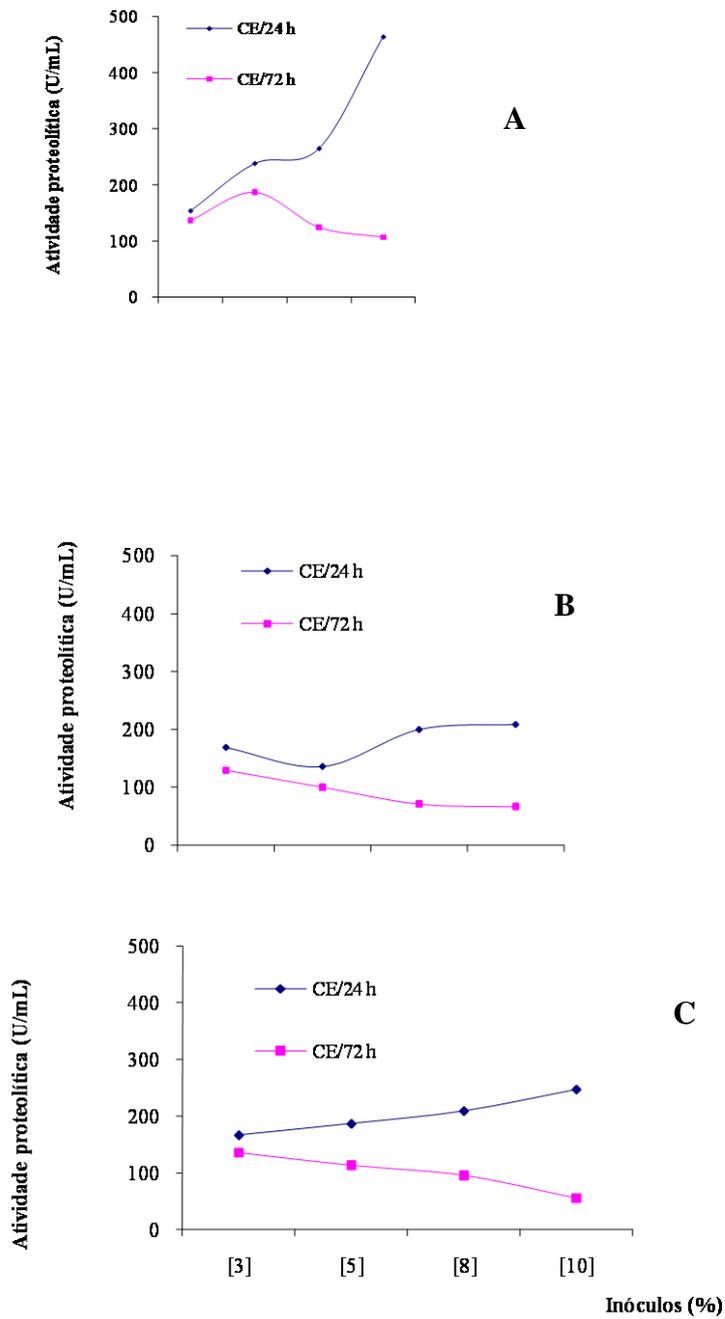
A contagem de células viáveis se realiza rotineiramente em processos industriais, esse procedimento permite analisar a estado fisiológico das culturas e também detectar uma possível contaminação das amostras (BECKER et al, 1996; BROCK et al, 1994; RHODES e STANBURY, 1997, NEVES et al, 2006). Com a finalidade de enumeração das células vivas foi realizado o método de contagem de células viáveis associada à determinação do quantitativo de UFC (Unidades Formadoras de Colônia). Os ensaios realizados para se determinar a viabilidade celular de *Trichosporon pullulans*, confirmaram o crescimento dessa espécie nos meios de cultura testados (ágar Sabouraud e ágar malte). Nas condições experimentais verificou-se o crescimento desta espécie, foi  $5,4 \times 10^6$  UFC em 48 horas.

Na produção de enzimas não só o número de células influencia, mas também o meio usado para fermentação, a temperatura usada para crescimento do microrganismo e a idade do inóculo (Papagianni e Moo-Young, 2001, NEVES et al, 2006).

A figura 4 demonstra o desempenho de *Trichosporon pullulans* quando se utilizou diferentes concentrações de inóculos em fermentação submersa. Os resultados mostraram que a maior atividade proteolítica (446,66 U/mL) foi obtida com inóculo equivalente a 10 % do volume de meio, meio de fermentação Extrato de Malte suplementado com gelatina 1 % e cultura estoque (CE) com 24 horas de crescimento em ágar Malte.

Os resultados evidenciaram que o tamanho e a idade do inóculo influenciaram diretamente na secreção de protease, tanto que, o aumento da atividade foi diretamente proporcional ao aumentou da concentração do inóculo quando se utilizou cultura estoque (CE) com 24 horas, o inverso foi observado com a cultura estoque (CE) obtida em 72 horas (Figura 4).

Outros parâmetros que influenciam no rendimento enzimático são a composição do meio, temperatura, período de incubação, e a capacidade de germinação dos esporos (STANBURY E WHITAKER, 1984; TEIXEIRA, 1997; PAPAGIANNI e MOO-YOUNG, 2002; NEVES et al, 2006). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Nampoothiri & Pandey (1995), Papagiannie & Moo-Young (2001), Neves et al (2006) e Lima et al (2009) onde a atividade enzimática foi diretamente influenciada pela concentração e idade do inóculo. Em seu trabalho com enzimas lignocelulolíticas de *Pleurotus ostreatus* Alexandrino et al (2009) verificaram a produção da enzima foi influenciada pelo crescimento fúngico.



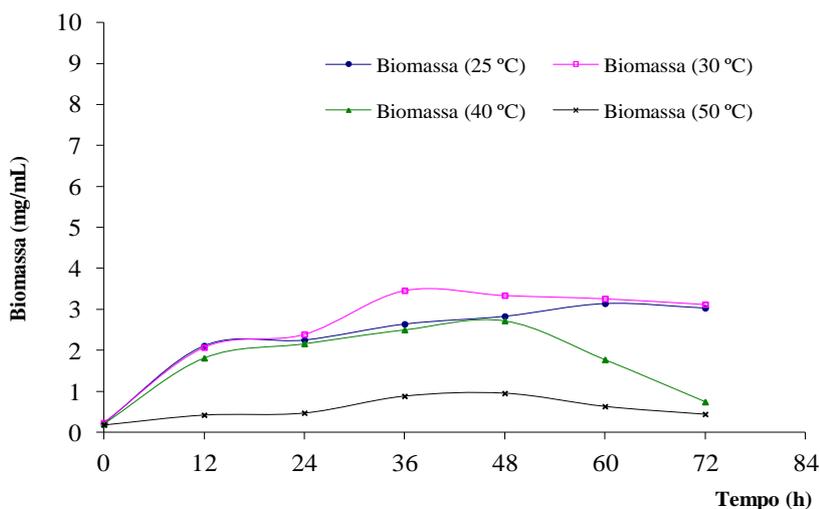
**Figura 4.**feito do tamanho e idade do inóculo em diferentes meios de cultura, na produção da protease produzida por *Trichosporon pullulans*. (A) Extrato de Malte; (B) Solução de Sais; (C) Caldo Sabouraud, todos suplementados com gelatina 1 %

A temperatura tem influência no crescimento e na sobrevivência dos microrganismos, e conseqüentemente, na produção de metabólitos primários e secundários. Usualmente o alcance de temperatura para um organismo viável está em torno de 30 °C e 40 °C, embora alguns microrganismos apresentem uma tolerância maior que outros (BROCK *et al*, 1994; NEVES *et al*, 2006; LOPES *et al* 2009).

Na figura 4 estão citados os dados relativos ao crescimento de *Trichosporon pullulans*. Esses resultados demonstraram que a 50 °C essa espécie expressou crescimento típico nas condições experimentais: a fase de adaptação durante 24 horas (biomassa = 0,47 mg/mL). A fase exponencial e estacionária foram observadas a cada 12 horas a partir de 36 horas (biomassa = 0,88 mg/mL) e a fase de declínio a partir de 48 horas (biomassa = 0,95 mg/mL). Nas temperaturas de 25 °C e 40 °C não foi observada a fase de adaptação, verificando-se, no entanto que entre 12 e 48 horas, *T. pullulans* apresentou crescimento similar, nesse período a média da biomassa correspondeu a 2,38 mg/mL. Nessas condições foi observada fase de declínio a 40 °C e a 25 °C a levedura permaneceu em crescimento.

*Trichosporon pullulans* expressou crescimento máximo (3,46 mg de biomassa/mL) a 30 °C, em 36 h de fermentação, sendo esta 72,55 % maior que biomassa observada de 50 °C (biomassa = 0,95 mg/mL), nessa temperatura o crescimento de *T. pullulans* foi do tipo diáuxico.

O crescimento diáuxico ocorre como conseqüência de repressão catabólica, quando duas fontes de energia encontram-se disponíveis no meio de cultura, o microrganismo utiliza inicialmente, uma das fontes. Ao término desta o microrganismo inicia o consumo da outra fonte disponível que se expressa por uma nova fase exponencial (BROCK *et al*, 1994; CRUEGER e CRUEGER, 1990). Provavelmente nessas condições de cultivo *T. pullulans* tenha utilizado uma fonte resultante do metabolismo da gelatina usada como substrato indutor.



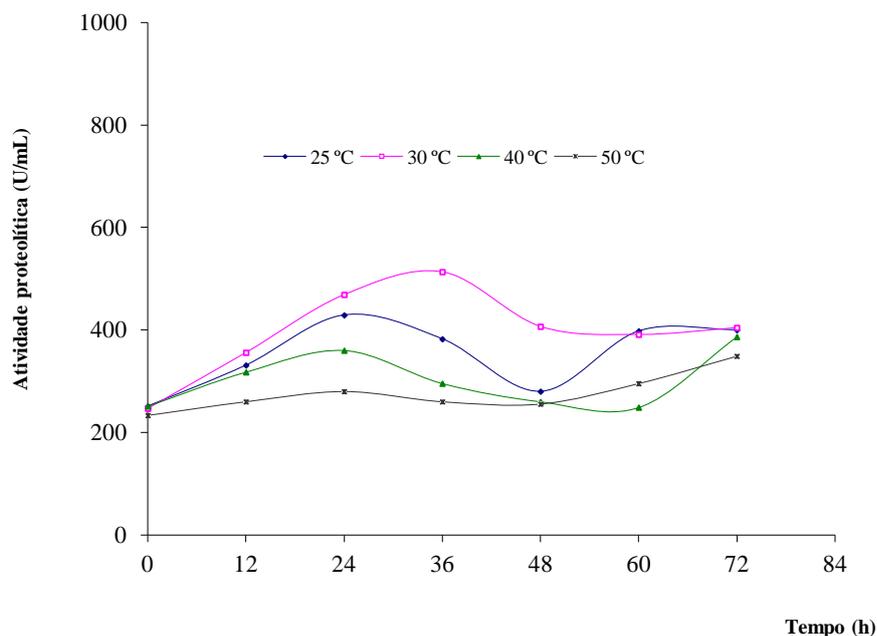
**Figura 5.** Influência da temperatura no crescimento de *Trichosporon pullulans* nos cultivos realizados em 40 mL de Extrato de Malte + gelatina 1%, sob agitação (140 rpm), em diferentes temperaturas

A temperatura constitui outro parâmetro crítico que influencia na produção de enzima, precisa ser controlado e varia de organismo para organismo (NEVES et al, 2006). A figura 5 expressa o efeito da temperatura na protease produzida por *T. pullulans*, analisada entre 25 °C e 50 °C, utilizando inóculo a 10 %. Observou-se que as atividades proteolíticas foram detectadas a partir de 12 horas em todas as temperaturas testadas.

A máxima atividade proteolítica produzida por *T. pullulans* foi 513,33 U/mL à 30 °C no período relativo à 36 horas (Figura 6). Os resultados demonstraram que a produção da protease acompanhou a fase de crescimento exponencial, sendo máxima produção de biomassa, também, em 36 horas (Figura 6). Estes resultados estão de acordo com as citações de Porto et al (1996); Petinate et al (1999) e Chantawannakul et al (2002) e Neves et al (2006). De acordo com esses resultados pode-se inferir que a melhor temperatura de crescimento será a melhor temperatura para produção da protease. Alexandrino et al (2010) em suas análises concluíram que *Pleurotus ostreatus* produziu a enzima entre 30° C e 40° C, temperaturas onde ocorreu as maiores taxas de crescimento.

Verificou-se ainda que os menores níveis de produção da protease de *T. pullulans* ocorreram a 50 °C demonstrando atividade máxima de 280,00 U/mL, no período de 24 horas de fermentação, correspondendo a um decréscimo de 45,46 % quando comparado aos níveis máximos da produção da enzima que ocorreu a 30 °C, em 36 horas (513, 33 U/mL).

Em todas as temperaturas, houve redução da atividade enzimática a partir de 36 horas e desrepressão a partir de 48 horas, provavelmente essa ação repressora esteja correlacionada com presença de biocompostos do metabolismo de *T. pullulans*, condição observada no cultivo de outros microrganismos (BROCK et al, 1994; RHODES e STANBURY, 1997; STANBURY e WHITAKER, 1984).



**Figura 6.** Influência da temperatura na produção da protease produzida por *Trichosporon pullulans* nos cultivos realizados em 40 mL de Extrato de Malte + gelatina 1%, sob agitação (140 rpm), em diferentes temperaturas

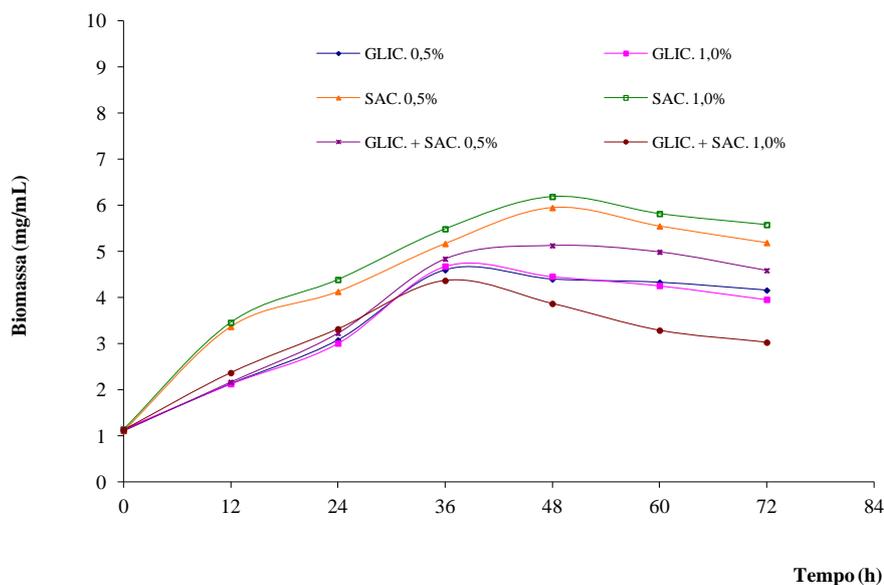
Microrganismos requerem fontes de carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e íons inorgânicos como fonte de energia exógena para seu crescimento. Fontes de carbono são necessárias para produção de massa celular e metabólitos (primários e secundários) e também como fontes de energia. (KUMAR e TAKAGI, 1999; RHODES e STANBURY, 1997; GONÇALVES, 2007)

Os experimentos realizados para investigar o efeito diferentes de fontes de carbono no crescimento de *T. pullulans* estão demonstrados na figura 6. Observa-se que *T. pullulans* cresceu no meio suplementado com fontes de carbono, sendo que o crescimento máximo correspondeu a biomassa de 6,18 mg/mL em meio suplementado com sacarose 1 % durante o início da fase estacionária (48 horas). Observou-se, também, considerável biomassa (5,94 mg/mL) quando sacarose 0,5 % foi adicionada ao meio de fermentação.

Outros autores observaram crescimento considerável quando sacarose foi adicionada ao meio (CRANDALL e EDWARDS, 1987; FENG et al, 2001; SHIMIZU et al, 1987, GONÇALVES, 2007, FREITAS e PINTO, 2009).

A presença de glicose, mesmo associada com sacarose em ambas concentrações, promoveu as menores taxa de crescimento correspondendo em média a 3,38 mg/mL. Crandall e Edwards (1987) verificaram um decréscimo na produção de proteases e no crescimento de *Candida albicans* quando glicose foi adicionada ao meio. Petinate et al (1999) investigaram a influência de fontes de carbono no crescimento e na produção de proteases por *Streptomyces cyaneus* e observaram uma redução na produção da enzima e no crescimento do microrganismo quando o meio de fermentação foi suplementado com glicose. Estes resultados reforçam a afirmação de repressão catabólica pela presença de glicose e sugerem que o crescimento de por *Trichosporon pullulans* foi parcialmente inibido pela adição de glicose.

Analisando os resultados obtidos verificou-se que a composição do meio pode influenciar a produção de proteases como citado por Vermelho et al (1996), Petinate et al (1999); Lopes et al (1999); Freitas e Pinto (2009)



**Figura 7.** Influência de diferentes fontes de carbono no crescimento de *Trichosporon pullulans*. GLIC.= Glicose, SAC.= Sacarose, GLIC.+ SAC.= Glicose+ Sacarose [0,5% e 1,0%]

Os experimentos realizados para investigar a influência de diferentes de fontes de carbono na produção de proteases por *Trichosporon pullulans* estão demonstrados na figura 7. *Trichosporon pulullans* cresceu no meio adicionado glicose e sacarose em diferentes concentrações.

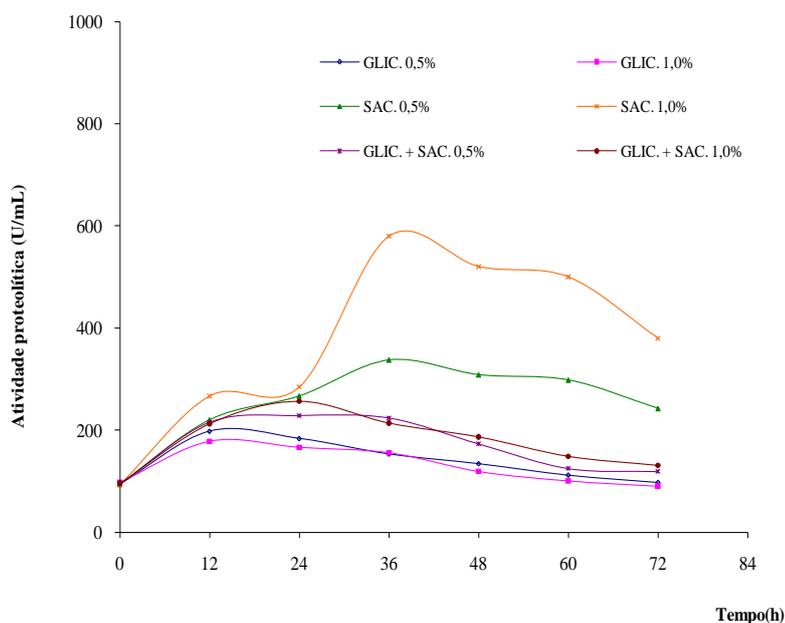
Quando *Trichosporon pullulans* foi cultivado em glicose 0,5 % as maiores atividades proteolíticas (198,00 U/mL e 183,66 U/mL) foram determinadas em 12 e 24 horas. Com glicose 1,0 % no mesmo período de fermentação as máximas atividades proteolíticas foram 165,98 U/mL e 178,00 U/mL, a partir desse horário com essa concentração de fonte de carbono houve decréscimo da atividade proteolítica.

Níveis maiores (337,33 U/mL e 580,00 U/mL) e equivalente de proteases foram observados com 0,5 % e 1 % de sacarose em 36 horas. Associação de fontes de carbono (glicose + sacarose 0,5 %) promoveu a redução subseqüentes das atividades proteolíticas cujos valores determinados foram 228, 54 U/mL e 223,69 U/mL em 24 e 36 horas,

respectivamente. Em idênticas condições de fermentação, mas utilizando-se glicose + sacarose 1,0 % o nível enzimático máximo correspondeu a 256,36 U/mL em 24 horas.

Esses resultados demonstraram que a atividade de protease, na fermentação com *Trichosporon pullulans*, foi superior quando se utilizou sacarose 1 % comparando-se aos demais substratos. No entanto, a redução da atividade proteásica foi destacada no meio contendo glicose quando comparada com a eficiência de sacarose 1,0 % e 0,5 %, respectivamente. Vários trabalhos têm indicado a redução na produção de proteases por repressão catabólica, fenômeno que comumente ocorre na presença de glicose (CHANTAWANNAKUL et al, 2002; PETINATE et al, 1999; TEIXEIRA, 1997).

Samaranayake et al (1984) e Ross et al (1990) observaram que quando glicose foi associada ao meio *Candida albicans* produziu proteases em baixos níveis, ocorrendo uma redução de 32 %. Nos trabalhos de Vermelho et al (1996) está demonstrado o aumento na produção de proteases quando o meio foi suplementado com sacarose e glicerol. Quando esses autores usaram somente glicose como fonte de carbono eles observaram acentuada redução na produção da enzima. O mesmo efeito foi detectado por Feng et al (2001) sendo que a redução na atividade proteolítica foi de 43 % nos cultivos de *Bacillus pumilus*, na presença de glicose.



**Figura 8.** Influência de diferentes fontes de carbono na produção da protease de *Trichosporon pullulans*. GLIC.= Glicose, SAC.= Sacarose, GLIC.+ SAC.= Glicose+ Sacarose [0,5% e 1,0%]

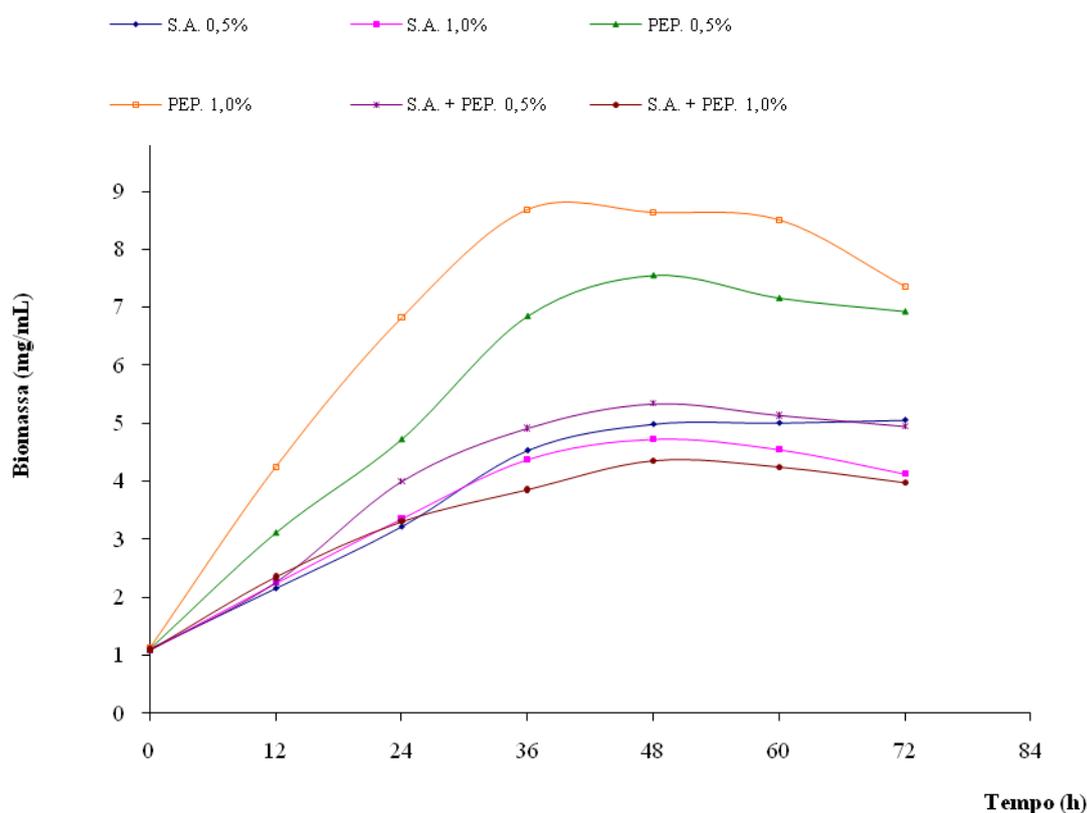
Muitos microrganismos utilizam o nitrogênio tanto em sua forma orgânica como inorgânica para metabolizar a produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas, compostos de parede e metabólitos (BROCK et al, 1994; KUMAR e TAKAGI, 1999 GONÇALVES, 2007, FREITAS e PINTO, 2009)

O efeito da presença de fontes de nitrogênio no crescimento de *T. pullulans* foi avaliado através do peso seco da biomassa (Figura 8). Ao observar os resultados verificou-se que o crescimento máximo de *Trichosporon pullulans* ocorreu no meio suplementado com peptona 1,0 % correspondendo a biomassa de 8,68 mg/mL, durante o final da fase de crescimento (36 horas).

Com peptona 0,5 % a máxima biomassa produzida correspondeu a 7,55 mg/mL. Do ponto de vista industrial torna-se mais vantajoso escolher peptona 0,5 % que peptona 1 %

visto que, com essa concentração foi verificada a produção de proteases em maiores níveis e também por motivos econômicos.

Os menores valores de biomassa foram obtidos nos meios de fermentação suplementados com sulfato de amônio, em ambas concentrações, sendo os valores máximos (biomassa = 5,05 mg/mL e 4,73 mg/mL). Resultados semelhantes foram obtidos por Ross et al (1990), em pesquisa para verificar a influência de fontes de nitrogênio no crescimento e produção de proteases por *Candida albicans* observaram que ao adicionar sulfato de amônio 2 % ocorreu crescimento e produção de proteases em baixas quantidades.



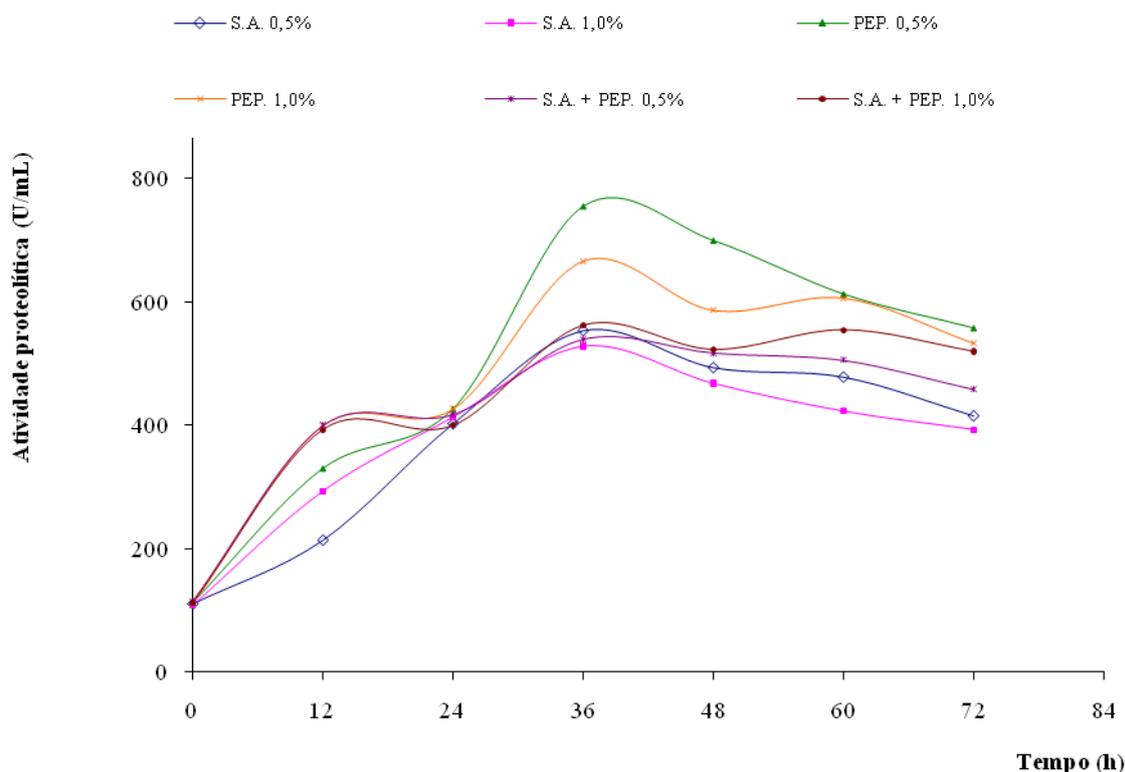
**Figura 9.** Influência de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento de *Trichosporon pullulans*. S.A.= Sulfato de amônio, PEP.= Peptona, S.A.+ PEP.= Sulfato de amônio+Peptona [0,5 % e 1,0 %]

Os resultados realizados para verificar a influência de fontes de nitrogênio na produção de proteases de *Trichosporon pullulans* estão apresentados na figura 9.

Dentre as fontes de nitrogênio analisadas a maior atividade proteolítica (755,55 U/mL) foi detectada no meio suplementado com peptona 0,5%, em 36 horas de fermentação. No mesmo período, com peptona 1,0 % a atividade proteásica foi igual a 666,66 U/mL, verificando-se decréscimo equivalente a 11,76 % nessas condições de cultivo. Na fermentação realizada somente com sulfato de amônio 0,5 % e 1 % como substrato, proporcionou a redução de 26,76 % e 30,07 % da atividade proteásica, respectivamente. Com sulfato de amônio + peptona os resultados foram aproximadamente semelhantes, contudo a eficiência desses substratos foi superior (6,03%) a sulfato de amônio 0,5% e 1,0%.

Em outros estudos, a presença de diferentes fontes de nitrogênio aumentou a produção de proteases, porém, altas concentrações podem inibir a síntese dessas enzimas, conforme dados obtidos por Crandall e Edwards (1987), Kumar e Takagi, (1999), Shimizu et al (1987), Freitas e Pinto (2009)

Nos trabalhos realizados com outras leveduras (*Candida albicans* e *Candida parapsilosis*) foi observado que peptona proporcionou o aumento na atividade proteolítica (CRANDALL e EDWARDS, 1987; RUCHEL et al, 1986).



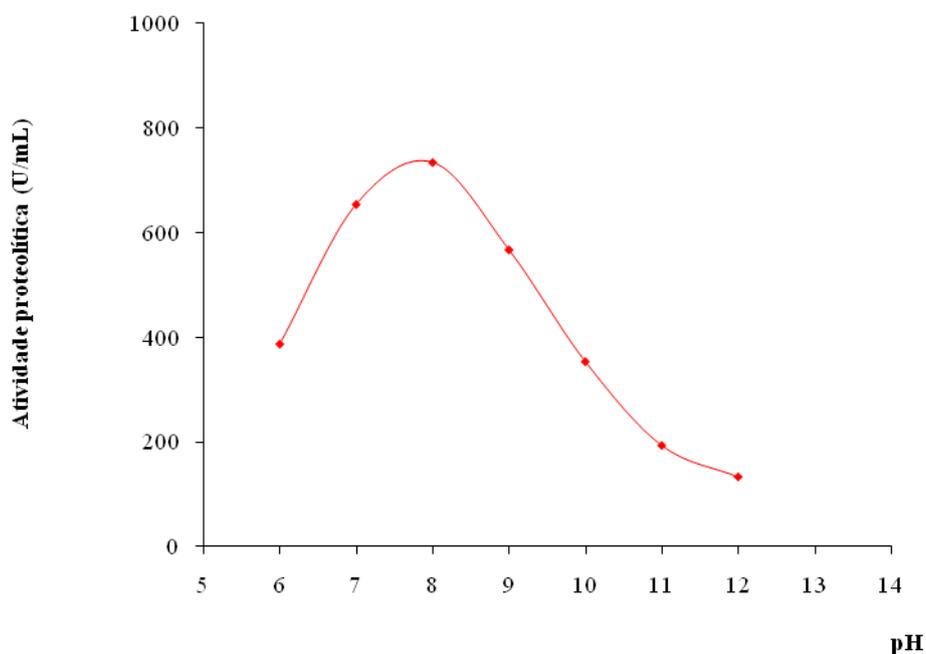
**Figura 10.** Influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção da protease de *Trichosporon pullulans*. S.A.= Sulfato de amônio, PEP.= Peptona, S.A.+ PEP.= Sulfato de amônio+Peptona [0,5 % e 1,0 %]

O pH afeta a produção de enzimas e está diretamente relacionado com o tipo de protease. Proteases de microrganismos são classificadas em ácidas, neutras e alcalinas (RAO et al, 1998).

Para avaliar o efeito do pH na atividade proteolítica foram utilizados os tampões: fosfato 0,1M (6-8) e carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M (9-12).

Com base nos resultados obtidos a protease produzida por *Trichosporon pullulans* apresentou pH ótimo 8,0 (Figura 11). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a protease produzida por *Trichosporon pullulans* classifica-se como protease neutra (pH ótimo 8,0). Esses resultados estão de acordo com os experimentos realizados por Ruchel et al (1986), Nelson e Young (1987), De Marco e Felix (2002) e Lopes et al (2009) com

*Candida parapsilosis*, *Candida olea*, *Candida* e *Trichoderma harzianum* respectivamente, os quais apresentaram atividade proteolítica entre pH 6,2 e 9,0.



**Figura 11.** Efeito do pH na atividade proteolítica de *Trichosporon pullulans*. O extrato enzimático foi analisado usando azocaseína 1 % como substrato, em tampão fosfato 0,1M (6-8) e carbonato-bicarbonato de sódio 0,1M (9-12)

A influência da temperatura no extrato enzimático de *Trichosporon pullulans* foi analisada, em diferentes temperaturas (25 °C, 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C e 80 °C) usando tampão fosfato 0,1M (pH 8,0).

A maior estabilidade térmica da protease produzida por *Trichosporon pullulans* foi observada a 37 °C onde a enzima manteve 100 % de sua atividade durante 40 minutos de incubação, só perdendo 50 % de sua atividade a 50 °C, em 40 minutos. Na temperatura de 40 °C, a enzima demonstrou 97 % de estabilidade até 40 minutos de incubação (Figura 12).

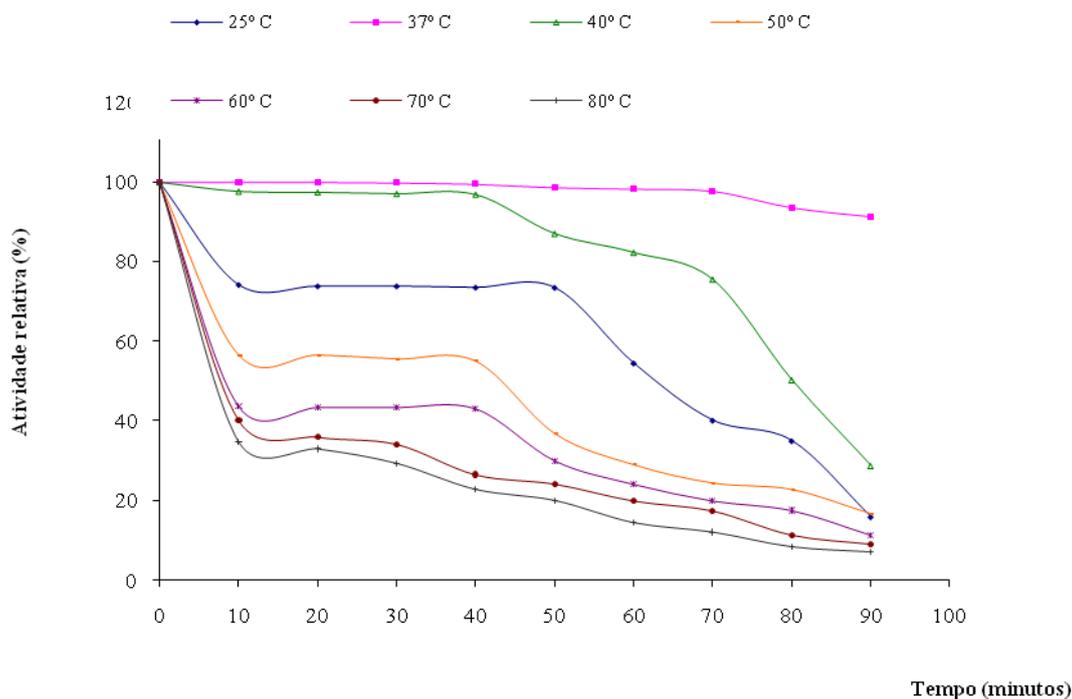
Foi observado, também, que na temperatura de 25 °C ocorreu uma redução na atividade proteolítica, onde a máxima atividade correspondeu a 74,24 % de atividade residual quando comparada à máxima atividade (880 U/mL) obtida à 37 °C.

De acordo com a figura 12 observa-se que a enzima começou a ser afetada a partir de 50 °C, sendo que nas temperaturas de 70 °C e 80 °C, a enzima mostrou-se menos estável atingindo 40,15 % e 34, 73 % de máxima atividade residual, comparando-se a máxima atividade obtida em 37 °C, esse resultado sugere que a enzima sofreu desnaturação.

Resultados semelhantes foram obtidos para proteases produzidas por *Streptomyces alboniger* e *Streptomyces cyaneus*, onde as enzimas foram inativadas quando incubadas a 60 °C por 30 minutos (LOPES *et al*, 1999; PETINATE *et al*, 1999)

Moreira *et al* (2002) observaram redução na atividade proteolítica em temperaturas superiores a 60 °C, em 60 minutos de incubação em trabalhos realizados com *Nocardiosis* sp.

Nelson e Young (1987), De Marco e Felix (2002) e Chantawannakul *et al* (2002), analisando proteases de *Candida olea*, *Trichoderma harzianum* e *Bacillus subtilis*, respectivamente, verificaram que protease secretada apresentou maior estabilidade a 37 °C.



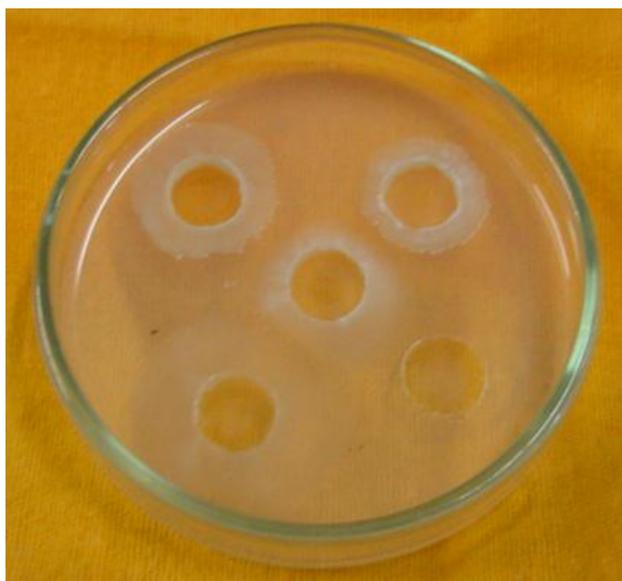
**Figura 12.** Termostabilidade da protease produzida por *Trichosporon pullulans*. O extrato enzimático foi analisado usando azocaseína 1%. A atividade enzimática foi determinada a cada 10 minutos

As colagenases de microrganismos possuem a capacidade de hidrolisar o colágeno nativo como o colágeno desnaturado, representando assim, uma fonte promissora para pesquisas e aplicações biotecnológicas (JUNG et al, 1998; ZIMMER et al, 2009). As colagenases possuem pH ótimo entre 7,5 – 8,0, temperatura ótima 37 ° C (TRAN e NAGANO, 2002).

Quanto à utilização das colagenases, pode-se afirmar que as possibilidades são bastante variadas. Uma delas é o debridamento enzimático de ferimentos, pela capacidade dessas enzimas degradarem o colágeno dos tecidos necrosados e facilitarem a cicatrização. Seu uso, com essa finalidade ocorre há bastante tempo e uma das colagenases produzidas por *C. histolyticum*, a clostriopectidase A, é também utilizada com esse objetivo. Resultados animadores foram obtidos em um estudo de fase III, utilizando uma colagenase

injetável no tratamento de Contratura de Dupuytren, uma condição que usualmente requer tratamento cirúrgico e intervenções recorrentes (ZIMMER et al, 2009).

Nas análises realizadas para se verificar a capacidade de *Trichosporon pullulans* degradar colágeno observou-se reação positiva e a dimensão do halo correspondeu a 28 mm (Figura 12). Matsushita et al (1994) investigaram o uso de colagenases de *Clostridium perfringens* no tratamento de escaras e verificaram que a cicatrização foi mais acelerada e o processo inflamatório menos intenso. Cheng et al (1999) observaram uma redução de 86% do volume de cicatrizes hipertróficas (quelóides), *in vivo*, usando no tratamento colagenases de bactérias. Lima et al (2009) estudaram uma cepa de *Candida albicans* produtora de colagenase com resultados promissores para a produção industrial.



**Figura 12.** Halo de degradação do colágeno produzido por *Trichosporon pullulans*, em meio sólido e colágeno como fonte de carbono

## 5.0 CONCLUSÕES

Nas condições analisadas *Trichosporon pullulans* apresentou as maiores atividades proteolíticas nos testes qualitativos e quantitativos. Sendo a temperatura ótima para obter maior crescimento e altos níveis de produção de proteases foram a 30 °C. A fonte de carbono que proporcionou atividades proteolíticas e crescimento expressivo foi sacarose 1,0 %. Glicose, mesmo quando associada com sacarose, demonstrou efeito repressor sobre o crescimento de *T. pullulans* e a produção da protease. Os maiores níveis de produção da protease foram obtidos com peptona 0,5 % como fonte de nitrogênio e peptona 1,0 % para o crescimento de *T. pullulans*. A presença de sulfato de amônio, em ambas concentrações, inibiu parcialmente o crescimento da levedura e a atividade proteolítica. A protease produzida por *Trichosporon pullulans* apresentou estabilidade em pH ótimo 8,0 e temperatura de 37 °C; *Trichosporon pullulans* degradou colágeno, em meio sólido, produzindo halos translúcidos, sendo um microrganismo potencial para uso biotecnológico e industrial.

## REFERÊNCIAS

AEHLE, W. (2007). **Enzymes in Industry**. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 489p.

BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W.; YARROW, D. (2000). **Yeast Characteristics and Identification**. 3. ed. Cambridge/USA: University Press, 1200 p.

BATURIN, D. A., et al. New enzymatic drug “Kollagel” in local treatment of burns. Disponível em: <<http://www.Scicometsoc.ru/en/journal/>>. Acesso em: 19/03/2003.

BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A. [et al].(2008). Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. *In*: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia**: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro:Editora Interciência, p. 433-488.

BROCK, T. D., [et al](1994). **Biology of Microorganisms**. 7. ed. Prentice-Hall International, Inc., 909 p.

CASTELLANI, A.1967. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of man in sterile distilled water. Further researches. *J. trop Med, Hyg*, vol. 70, p. 181-184.

CHANTAWANNAKUL, P., et al. (2002). Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. **Science Asia**, v. 28, p. 241-245;

CHENG, H.; SUN, G.; GUAN, Z. (1999). Experimental study clinical application of bacterial collagenase in catabolizing scars. **Zhonghua Zheng Xing Shao Wai Ke Za Zhi**. v. 15, n. 3, p. 202-205.

CRANDALL, M.; EDWARDS, J.; E. (1987).Segregation of proteinase-negative mutants from heterozygous *Candida albicans*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 133, 2817-2820

DE MARCO, J.L.; FELIX, C.R.(2002). Characterization of a proteases produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant witches' broom disease. **BMC Biochemistry**. v. 3, p. 1-7;

DETSINA, A. N. Vitaminization of a skin. Cosmetological “non-limit”. Disponível em: <<http://www.Scicometsoc.ru/en/journal/>>. Acesso em: 19/03/2003.

DOMOGATSKY, S. Highly selective proteolytic enzymes preparation for debridement of necrotic tissue from burn wounds. Disponível em:<<http://www.crd.org/Events/bio2003-proteolityc-enzymes>>. Acesso: 20/08/2003

JING, L.I.; PENG, I.; WANG, X.; CHI, Z. (2010). Optium Production and Characterization of acid protease from marine yeast *Metschnikowia reukaufii* w6d. J. Ocean Univ. China, vol.4, p. 359-364

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. (1999). Microbial alkaline proteases. **Biotechnology Advances**. v. 17, n. 7, p. 561-594.

LEIGHTON, T .J., et al. (1973). The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **J. Mol. Biol.**, v.76, p.103-122, 1973.

LIMA, C. A.; RODRIGUES, P. M. B.; PORTO, T. S. [et al]. (2009). Production of collagenase from *Candida albicans* (URM3622). Vol 43, p. 315-320

MATSUSHITA, O., et al (1994). Purification and characterization of *Clostridium perfringens* 120-KD collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene. **J. Bacteriol**, v. 176, n. 1, p. 149-156

MOREIRA, K. A.; PORTO, T. S.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; LIMA FILHO, J. L.(2002). New alkaline protease from *Nocardiosis* sp: partial purification and characterization. **Process Biochemistry**, p. 1-6

NAMPOOTHIRI, K. M.; PANDEY, A. (1995). Glutamic acid fermentation *Brevibacterium* DSM 20411. **J. food Sci. Technol.**, v. 32, n. 5, p. 406-408;

NELSON, G.; YOUNG, T. W. (1987). Extracellular acid and alkaline proteases from *Candida olea*. **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 1461 – 1469

NEVES, K. C. S.; PORTO, A. L. F.; TEIXEIRA, M. F. S. (2006). **Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular**. Acta Amazonica. Vol 36(3) p. 299 – 306

NUNES, T. A. (1998). **Espécies de *Cladosporium* Link ex. Fr. de interesse médico isoladas de solo e de vegetais de áreas de lazer da cidade do Recife, PE, Brasil**. 69 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

PAPAGIANNI, M.; MOO-YOUNG, M. (2002). Protease secretion in glucomylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. **Process Biochemistry**, v.37, p. 1271-1278

PETINATE, S. D. G., et al. (1999). Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 173-177

PICHOVA, I., et al. (2001). Secreted aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, n. 9, p. 2669-2677;

Price, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. (20): 7-14.

PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M.; LIMA FILHO, J. L. (1996). Effects of culture conditions on protease production by *Streptomyces clavuligerus* growing on the soy bean flour medium. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 60, p. 115-122

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

RUCHEL, R.; BONING, B.; BORG, M. (1986). Characterization of the secretory acid proteinase of *Candida parapsilosis* and evidence for the absence of the enzyme during infection *in vitro*. **Infect. Immun.**, v. 53, p. 411-417

SANTOS, E. P. (1997). Enzimas em cosmetologia. In: Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 3, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos do 3º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática/97**. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 45 p.

SOARES, V. F.; FERREIRA, V. S.; BON, E. P. S. 1999. **Produção de Proteases de *Bacillus subtilis* usando óleo de soja como fonte de carbono**. In: 4º Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp.

SOARES, M. T. C. V. (2001). **Produção, Caracterização e Purificação parcial de proteases coagulantes do leite produzidas por *Nocardia* sp**, 75 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

STANBURY, F. P.; WHITAKER, A. (1984). **Principles of fermentation technology**. 1 ed. Pergamon Press, 255 p.

TEIXEIRA, M. F. S., [ et al] (1996). Determinação qualitativa de proteases: método de cup-plate modificado. **Rev. UFAM**, Série: Ciências da Saúde, v. 4/5, n. 1/2, p. 39-45

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

VERMELHO, A. B., et al (1996). Detection of extracellular proteases from microorganisms on Agar plates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 91, n. 6, p. 755- 760

VIANA, D. A.; LIMA, C. A.; NEVES, R. J. [et al].(2010). Production and stability of protease from *Candida buinensis*. *Appl Biochem Biotechnol*. Vol 162, p. 830-842

ZIMMER, K. R.; BORRÉ, G. L.; TRETIN, D. S. [et al]. (2009). **Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico**. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 123-137.

## ANEXOS

### 1.0 Meios de cultura

#### 1.1 Ágar-Malte

Extrato de malte (DIFCO) .....	30 g
Ágar .....	15 g
Água destilada .....	1000 mL
pH = 5,5	

Dissolver o ágar e o extrato de malte em água destilada, aquecendo-os em banho-maria. Distribuir em tubos e esterilizar a 120 °C, durante 15 minutos.

#### 1.2 Ágar-Sabouraud

Dextrose .....	40 g
Peptona .....	10 g
Ágar .....	15 g
Água destilada .....	1000 mL

Dissolver o ágar em 1000 mL de água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Adicionar a dextrose e a peptona, misturando-as bem. Então autoclavar a 120 °C, durante 15 minutos.

#### 1.3 Ágar-Água (1,8%)

Ágar (1,8%) .....	18 g
Água destilada .....	1000 mL

Dissolver o ágar em 1000 mL de água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Então autoclavar a 120 °C, durante 15 minutos. Distribuir em placa de Petri com os devidos cuidados assépticos.

#### 1.4 Ágar-Gelatina- leite

Ágar .....	9g
Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 .....	400mL
Solução de leite 10% .....	50mL
Solução de gelatina 10% .....	50mL

Dissolver o ágar no tampão, homogenizar em banho-maria ou agitador magnético com aquecimento. Autoclavar a 120° C por 15 minutos. Deixar esfriar aproximadamente a 60 ° a 50° C. Para a obtenção do ágar-gelatina-leite as soluções esterilizadas de ágar, gelatina e leite foram misturadas, com os devidos cuidados assépticos. Então distribuir em placa de Petri e levar para refrigeração (4°C) por aproximadamente uma hora, logo em seguida, foram feitos “cup-plate”, onde foi inoculado o extrato.

#### 1.5 Ágar-Colágeno

Ágar .....	9g
Tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 .....	500mL
Colágeno solúvel .....	5g

Dissolver o ágar em 450 mL de tampão, homogenizar em banho-maria ou agitador magnético com aquecimento. Deixar esfriar aproximadamente a 60 ° a 50° C. Dissolver 5g colágeno em 50 mL de tampão. Misturar bem as duas soluções até homogenizar. Autoclavar a 120° C por 15 minutos. Então distribuir em placa de Petri e levar para refrigeração (4°C) por aproximadamente uma hora, logo em seguida, foram feitos “cup-plate”, onde foi inoculado o extrato.

#### 1.6 Fosfolipase

Dextrose .....	40 g
Peptona .....	10 g
Ágar .....	18 g
Gema de ovo .....	01

Cloreto de sódio .....	0,45625 g
Cloreto de cálcio .....	1,3875 g
Água destilada .....	1000 mL
pH = 6,9	

Dissolver o ágar em 1000 mL de água destilada, aquecendo-o em banho-maria. Deixar esfriar e adicionar os demais componentes do meio. Cuidado ao acrescentar a gema de ovo, pois é sem clara e sem quebrá-la. Então autoclavar a 120 °C, durante 15 minutos. Distribuir em placa de Petri com os devidos cuidados assépticos.

### 1.7 Ágar-Christensen (Urease)

#### Solução A

Bio gelytone .....	1,0 g
Glicose .....	1,0 g
Cloreto de sódio .....	5,0 g
Fosfato monopotássico .....	2,0 g
Uréia .....	20,0 g
Vermelho fenol .....	12,0 mg

#### Solução B

Ágar .....	15 g
Água destilada .....	900 mL
pH = 6,8	

Dissolver 29 g do meio desidratado (solução A), esterilizar por filtração. Dissolver o ágar em água destilada, aquecer e ferver até a dissolução completa. Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos. Deixar esfriar (50 °C) e adicionar a solução A assepticamente. Distribuir em tubos de ensaio.

### 1.8 Extrato de Malte (Gelatina 1%)

Extrato de malte .....	15 g
Gelatina 1% .....	10g
Água destilada .....	1000 mL

Dissolver o extrato de malte em 1000 mL de água destilada, homogenizar até completa dissolução. Em seguida acrescentar a gelatina e então aquecer a 40 °C sob agitação. Distribuir em erlenmeyers e então autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

### 1.9 Meio de cultura: solução de sais (Garcia-Garibay *et al*, 1987)

Extrato de levedura .....	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Mg SO <sub>4</sub> .....	0,5 g
Gelatina 1% .....	10g
Água destilada .....	1000 mL
PH = 5,5	

Dissolver cada um dos componentes menos a gelatina em 1000 mL de água destilada, homogenizar até completa dissolução. Em seguida acrescentar a gelatina e então aquecer a 40 °C sob agitação. Distribuir em erlenmeyers e então autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

### 1.10 Caldo Sobouraud

Peptona .....	10 g
Gelatina 1% .....	10g
Água destilada .....	1000 mL

Dissolver a peptona em 1000 mL de água destilada, homogenizar até completa dissolução. Em seguida acrescentar a gelatina e então aquecer a 40 °C sob agitação. Distribuir em erlenmeyers e então autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

### **1.10 Corn Meal**

Corn Meal ..... 50 g  
Ágar bacteriológico..... 15g  
Água destilada ..... 1000 mL  
PH = 6,0

Dissolver 17 g em 1000 mL de água destilada, homogenizar até completa dissolução. Autoclavar a 120 °C durante 15 minutos.

## **2. Soluções**

### **2.1 Solução de Gelatina (10%)**

Dissolver 5g de gelatina em 50mL da solução tampão, deixar em repouso por três minutos e homogenizar. Usar um agitador magnético para dissolução completa e depois esterilizar a 120° C por 15 minutos.

### **2.2 Solução de Leite (10%)**

Dissolver 5g de leite desnatado em 50mL de água destilada esterilizada. Esterilizar a solução vapor fluente (autoclave com a válvula aberta ou em panela de pressão) durante 15 minutos por dois dias consecutivos.

### **2.3 Azocaseína (1%)**

Dissolver 0,1 g de azocaseína em 10 mL de Tris-HCl 0,2 M pH 7,2 contendo CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM. A solução de azocaseína deve ser protegida contra luz.

### **2.4 Ácido Tricloroacético (10%)**

Pesar 10 g de ácido tricloroacético e diluir em 100 mL de água destilada.

Homogenizar em agitador magnético até completa dissolução.

## **2.5 NaOH (1 M)**

Pesar 4 g de NaOH e diluir em 100 mL de água destilada. Homogenizar em agitador magnético até completa dissolução.

## **3.0 Tampões**

### **3.1 Citrato-fosfato (pH=5,0; 0,1M)**

#### **Solução-Estoque**

Solução A: dissolver o ácido cítrico 19,21 g em 200 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL.

Solução B: dissolver 26,80 g de fosfato de sódio dibásico em 100 mL de água destilada e completar o volume para 1000 mL.

#### **Solução Uso**

Retirar 243 mL da solução A + 257 mL da solução B, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

### **3.2 Tris-HCl (pH=7,2; 0,2M) contendo CaCl<sub>2</sub> 1,0 mM**

#### **Solução-Estoque**

Solução A: dissolver o 24,29 g de Tris (hidrometil aminometano) em de água destilada 1000 mL.

Solução B: misturar 7,3 mL de ácido clorídrico (HCl) em 1000 mL de água destilada.

#### **Solução Uso**

Retirar 50 mL da solução A + 44,2 mL da solução B, completar o volume par 200 mL homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar. Acrescentar 0,147 g de CaCl<sub>2</sub>.

### **3.3 Fosfato (pH=6,0; 0,1M)**

#### **Solução-Estoque**

Solução A: dissolver o fosfato de sódio monobásico 27,8 g em 1000 mL de água destilada.

Solução B: dissolver 53,65 g de fosfato de sódio dibásico em 1000 mL de água destilada.

#### **Solução Uso**

Retirar 87,7 mL da solução A + 12,3 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

### **3.4 Fosfato (pH=7,0; 0,1M)**

#### **Solução Uso**

Retirar 39 mL da solução A + 61 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

### **3.5 Fosfato (pH=8,0; 0,1M)**

#### **Solução Uso**

Retirar 5,3 mL da solução A + 94,7 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

### **3.6 Carbonato-Bicarbonato de sódio (pH=9,0; 0,1M)**

#### **Solução-Estoque**

Solução A: dissolver o carbonato de sódio 21,2 g em 1000 mL de água destilada.

Solução B: dissolver 16,8 g de bicarbonato de sódio em 1000 mL de água destilada.

#### **Solução Uso**

Retirar 4,0 mL da solução A + 46,0 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

### **3.7 Carbonato-Bicarbonato (pH=10,0; 0,1M)**

**Solução Uso**

Retirar 27,5 mL da solução A + 22,5 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

**3.8 Carbonato-Bicarbonato (pH=11,0; 0,1M)****Solução Uso**

Retirar 45,0 mL da solução A + 5,0 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.

**3.9 Carbonato-Bicarbonato (pH=12,0; 0,1M)****Solução Uso**

Retirar 48,0 mL da solução A + 2,0 mL da solução B. Completar o volume para 200 mL com água destilada, homogenizar e aferir o pH, se necessário ajustar.