

Seleção de leveduras da Região Amazônica para produção de protease extracelular

Kilma Cristiane SILVA NEVES¹; Ana Lúcia Figueiredo PORTO^{2,3}; Maria Francisca Simas TEIXEIRA⁴

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar 50 leveduras isoladas a partir de diferentes substratos da Região Amazônica e selecionar uma espécie de maior atividade proteolítica. Entre as 26 espécies identificadas predominaram *Candida aquatica* (12%) e *Candida tropicalis* (10%). A fermentação submersa foi realizada em Extrato de Malte suplementado com gelatina 1%, *Candida intermedia* foi a que expressou maior atividade proteolítica, halo = 25 mm e 273 U/mL, crescimento máximo a 30 °C, viabilidade celular $6,2 \times 10^6$ UFC, em 48 horas, não demonstrou características de patogenicidade e a melhor densidade do inóculo foi 3%, utilizando-se culturas com 24 horas de crescimento em ágar Malte.

PALAVRAS-CHAVES

Leveduras, Região Amazônica, Protease

Screening of yeasts from Amazon Region for extracellular protease production

ABSTRACT

*The objective of this work was to identify 50 yeasts isolates obtained from different substrates from Amazon Region and to select one species of higher proteolytic activity. Among the 26 identified species it had predominance of *Candida aquatica* (12%) and *Candida tropicalis* (10%). The submerged fermentation was carried out in Malt Extract supplemented with gelatin 1%, *Candida intermedia* exhibited higher proteolytic activity, halo = 25 mm and 273 U/mL, the maximum growth 30 °C, the cellular viability 6.2×10^6 UFC, in 48 hours, did not demonstrate pathogenicity characteristics and the best inoculum density tested was 3%, using 24 hours Malt agar cultures.*

KEY-WORDS

Yeasts, Amazon Region, Protease

¹ Departamento de Parasitologia – Laboratório de Micologia/ UFAM – Av. Gen. Otávio Jordão Ramos, n. 3000, Coroado I, Minicampus Universitário – Aleixo. CEP 69077-000. E-mail: kicri@uol.com.br

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/ UFRPE - Rua D. Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos. CEP: 52171-300. E-mail: anaporto@ufrpe.br

³ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami- Lika/ UFPE - Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária. CEP: 50670-901 E-mail: anaporto@lika.ufpe.br

⁴ Departamento de Parasitologia – Laboratório de Micologia/ UFAM – Av. Gen. Otávio Jordão Ramos, n. 3000, Coroado I, Minicampus Universitário – Aleixo. CEP 69077-000. E-mail: mteixeira@ufam.edu.br

INTRODUÇÃO

Proteases são utilizadas em diversas atividades industriais tais como processamento de alimentos, bebidas, formulação de detergentes, processamento de couro e pele, no amaciamento de carne e formulação de medicamentos etc. O uso dessas enzimas corresponde a 40% do mercado mundial de biocatalisadores, avaliado em 1 bilhão de dólares (Soares *et al.*, 1999).

São fontes de proteases, os vegetais, animais e microrganismos (fungos e bactérias). Entre os microrganismos produtores de enzimas as leveduras têm destaque como fonte de biocompostos, entre os quais predominam as proteínas. São microrganismos bastante usados na indústria de alimentos porque a maioria das espécies não apresenta características patogênicas (Rodrigues & Sant'anna, 2001).

Na natureza grande parte da atividade necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos e bactérias produtores de enzimas. Tais microrganismos representam excelente fonte de enzimas devido à facilidade de manipulação genética e a ampla diversidade bioquímica. Nesse contexto, as proteases de origem microbiana são preferidas em relação às de origem animal e vegetal por expressarem características desejadas para aplicação biotecnológica (Godfrey & West, 1996).

As leveduras têm distribuição mundial e metabolismo diversificado, especialidade fisiológica que proporciona a utilização de uma variedade de nutrientes em distintas condições ambientais (Kirsop & Kurtzman, 1988; Tornai-Lehoczki *et al.*, 2003).

As leveduras são muito versáteis e muitas delas são peculiarmente apropriadas para propósitos industriais. Identificar leveduras de forma rápida e confiável pode ser importante na indústria, para estabelecer precisamente as causas de contaminação indesejada, e na medicina, para o diagnóstico de certas doenças. Uma identificação rápida em certos contextos também pode ser crucial, como por exemplo, quando uma determinada levedura está sendo utilizada industrialmente ou em experimentos de laboratório (Barnett, 1990).

Devido o grande potencial microbiológico da Região Amazônica e a crescente aplicabilidade de enzimas na área biotecnológica, torna-se viável selecionar e identificar microrganismos produtores do complexo proteolítico. O objetivo deste trabalho foi investigar a potencialidade de leveduras isoladas de diferentes substratos da Região Amazônica na produção de proteases para aplicação na indústria.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 50 amostras de leveduras da Região Amazônica pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Lipomyces*, *Dekkera*, *Pichia*, *Sporobolomyces* e *Hansenula*, do acervo da micoteca do

Departamento de Parasitologia da Universidade do Amazonas. Após reativação das culturas preservadas em água destilada esterilizada, as leveduras foram identificadas, em nível de espécie, com base nas características morfológicas, de reprodução e fisiológicas (Barnett *et al.*, 1990; Fisher & Cook, 1998; Kreger Van Rij, 1984; Lodder, 1984). Utilizou-se também o sistema de identificação comercial API 20C AUX (bioMérieux).

Para selecionar uma espécie produtora de alta atividade proteolítica, as leveduras foram cultivadas em ágar Malte, a 30 °C por 72 horas para obtenção de cultura-estoque. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados foram submetidos à estatística descritiva de acordo com Callegari-Jacques (2003), utilizou-se o programa Microsoft/Excel, 2000 e os resultados expressos em média.

A partir da cultura-estoque foi preparada suspensão padronizada pela escala de MacFarland 3. De cada suspensão foi retirado 1000 mL para inoculação em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de Extrato de Malte com gelatina 1% (p/v). A fermentação submersa foi mantida a 30 °C, sob agitação (140 rpm) e após 72 horas a biomassa foi separada do extrato enzimático por centrifugação (12.000 g/ 5 min.) (Barnett *et al.*, 1990; Becker *et al.*, 1996; Porto *et al.*, 1996). A atividade enzimática foi determinada pelo método de *cup-plate*, em ágar gelatina-leite, de acordo com a metodologia descrita por Teixeira *et al.* (1996).

No sobrenadante foi determinada a atividade proteolítica a 37 °C utilizando-se como substrato azocaseína 1,0% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO USA), em tampão 0,2 M Tris-HCl, pH 7,2, contendo 1,0 mM de CaCl₂ (Dosoretz *et al.*, 1990; Leighton *et al.*, 1973; Porto *et al.*, 1996). Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir um aumento na absorvância de 0,001/min. em uma hora a 440nm, sendo expressa em U/mL.

Para manutenção de cultura pura e produção de células viáveis da espécie proteolítica selecionada, fragmentos de cultura monospórica foram transferidos para ágar Sabouraud e ágar Malte. Os cultivos em tubo de ensaio foram mantidos a 30 °C durante 24 horas para realização dos experimentos descritos a seguir.

Para identificação dos fatores de patogenicidade foram consideradas as seguintes características: atividade fosfolipásica, ureásica e o crescimento a 37 °C (Nunes, 1998; Price *et al.*, 1982), e a viabilidade celular foi determinada por meio da técnica de semeadura em profundidade em ágar Malte. As placas foram incubadas a 30 °C por 72 horas. As colônias foram contadas e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) (Brock *et al.*, 1994).

A produção de protease pela espécie selecionada foi realizada por fermentação submersa. Determinou-se o tamanho e a idade do inóculo preparando-se uma suspensão celular nas culturas-estoque obtidas em ágar Malte, ágar Sabouraud e ágar com sais minerais, inclinado, a 30 °C, durante 24 e 72 horas. Todas as

suspensões foram padronizadas pela Escala de MacFarland 3.

De cada suspensão foi retirada uma alíquota correspondente às seguintes concentrações: 3%, 5%, 8% e 10% (v/v) para ser adicionada em Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de Caldo de Sabouraud, Extrato de Malte e solução de sais, todos suplementados com gelatina 1% (García-Garibay *et al.*, 1987; Nampoothiri & Pandey, 1995; Stanbury & Whitaker, 1994).

Os cultivos foram mantidos a 30° C sob agitação (140 rpm). Após 24 horas esses cultivos foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL, obtendo-se um volume final de 40 mL dos meios utilizados experimentalmente. A fermentação foi mantida a 30 °C, a 140 rpm por 72 horas. Ao término do processo de fermentação a biomassa foi separada do extrato enzimático por centrifugação e a atividade enzimática foi determinada de acordo com a metodologia recomendada por Porto *et al.* (1996).

Na determinação da temperatura ótima de crescimento e produção de protease a 25 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C utilizou-se o inóculo padronizado em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL do meio. Os cultivos foram mantidos sob agitação (140 rpm). Após 24 horas de fermentação os cultivos foram transferidos para Erlenmeyers de 125 mL de forma a se obter volume final de 40 mL do meio.

O crescimento da espécie selecionada 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.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes à identificação das 50 amostras de leveduras pertencentes aos gêneros *Candida*, *Cryptococcus*,

Dekkera, *Hansenula*, *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Sporobolomyces* e *Trichosporon* demonstraram que essas unidades taxonômicas estavam representadas por 26 espécies (Figura 1). Entre estas, as de maior frequência foram *Candida aquatica* (12 %) e *Candida tropicalis* (10 %).

Entre as leveduras, diversas espécies estão associadas a processos industriais e/ou descritas como patogênicas oportunistas. São microrganismos de relevância por serem ótimas produtoras de biocompostos e constituírem fonte de proteínas e vitaminas (Aoki *et al.*, 1994; Kirsop & Kurtzman, 1888; Macdonald & Odds, 1980; Shimizu *et al.*, 1987; Yamamoto *et al.*, 1992).

Para utilização de fonte microbiana na produção de compostos ou 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). Nas análises realizadas para detecção dos fatores de patogenicidade de *Candida intermedia*, observou-se o crescimento positivo a 37 °C. No entanto, não se detectou atividade fosfolipásica nem ureásica.

Os dados disponíveis não são suficientes para classificar *Candida intermedia* como patogênica, visto que um único fator não pode determinar a virulência de qualquer espécie fúngica, mas depende de um conjunto de fatores, a exemplo da capacidade de adesão, produção de fosfolipase, urease, crescimento a 37 °C e adaptação morfo genética às condições do hospedeiro (Mendes-Giannini *et al.*, 1997; Midgley *et al.*, 1998).

O microrganismo deve apresentar viabilidade celular para ser efetivo nos processos de fermentação. A viabilidade celular corresponde à capacidade da célula se dividir e formar sucessivas novas células. A maneira usual de se realizar a contagem de células viáveis baseia-se na determinação do número de células na amostra capazes de formar colônias no meio de cultura seletivo. Através

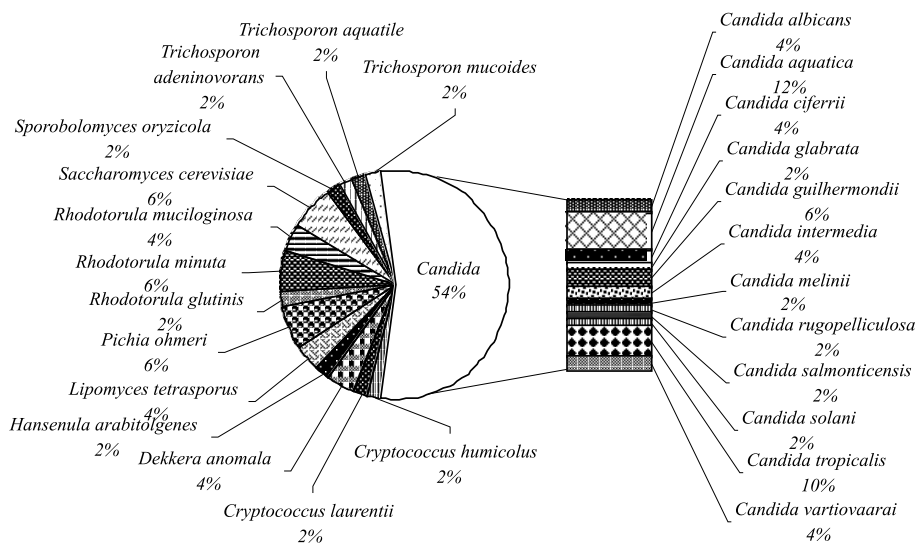


Figura 1 - Frequência das espécies de leveduras da Região Amazônica selecionadas para produção de protease extracelular.

Tabela 1 - Produção de protease por diferentes espécies de leveduras, em Extrato de Malte suplementado com gelatina 1%, a 30 °C, sob agitação (140 rpm), durante 72 horas.

Espécies	Atividade proteolítica		Espécies	Atividade proteolítica	
	(mm)	(U/mL)		(mm)	(U/mL)
<i>Candida albicans</i>	16	31 ± 0,00	<i>Candida vartiovaarai</i>	12	40 ± 0,19
<i>Candida albicans</i>	15	71 ± 0,00	<i>Candida vartiovaarai</i>	12	53 ± 0,38
<i>Candida aquatica</i>	13	255 ± 0,58	<i>Cryptococcus humicolus</i>	0	0 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	10	184 ± 0,00	<i>Cryptococcus laurentii</i>	10	31 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	12	51 ± 0,00	<i>Dekkera anomala</i>	10	44 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	12	38 ± 0,19	<i>Dekkera anomala</i>	20	60 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	13	47 ± 0,58	<i>Hansenula arabitolgenes</i>	11	22 ± 0,00
<i>Candida aquatica</i>	10	40 ± 0,00	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	10	27 ± 0,00
<i>Candida ciferrii</i>	20	78 ± 0,00	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	18	53 ± 0,38
<i>Candida ciferrii</i>	10	53 ± 0,00	<i>Pichia ohmeri</i>	13	33 ± 0,03
<i>Candida glabrata</i>	10	11 ± 0,00	<i>Pichia ohmeri</i>	10	47 ± 0,00
<i>Candida guilhermondii</i>	10	80 ± 0,00	<i>Pichia ohmeri</i>	13	47 ± 0,00
<i>Candida guilhermondii</i>	12	47 ± 0,00	<i>Rhodotorula glutinis</i>	12	27 ± 0,00
<i>Candida guilhermondii</i>	10	24 ± 0,00	<i>Rhodotorula minuta</i>	17	55 ± 0,00
<i>Candida intermedia</i>	18	64 ± 0,00	<i>Rhodotorula minuta</i>	10	29 ± 0,00
<i>Candida intermedia</i>	25	273 ± 0,00	<i>Rhodotorula minuta</i>	15	33 ± 0,00
<i>Candida melinii</i>	12	78 ± 0,00	<i>Rhodotorula muciloginosa</i>	11	20 ± 0,38
<i>Candida rugopelliculosa</i>	20	44 ± 0,00	<i>Rhodotorula muciloginosa</i>	12	27 ± 0,00
<i>Candida salmonticensis</i>	12	71 ± 0,00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	80 ± 0,03
<i>Candida solani</i>	19	55 ± 0,37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	35 ± 0,00
<i>Candida tropicalis</i>	15	18 ± 0,00	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10	31 ± 0,19
<i>Candida tropicalis</i>	15	22 ± 0,21	<i>Sporobolomyces oryzaicola</i>	17	51 ± 0,00
<i>Candida tropicalis</i>	23	40 ± 0,00	<i>Trichosporon adeninovorans</i>	16	40 ± 0,00
<i>Candida tropicalis</i>	10	38 ± 0,03	<i>Trichosporon aquatile</i>	10	140 ± 0,57
<i>Candida tropicalis</i>	12	44 ± 0,00	<i>Trichosporon mucoides</i>	12	33 ± 0,00

do procedimento de contagem celular presume-se que cada célula viável irá produzir uma colônia (Brock *et al.*, 1994).

Com o objetivo de contar apenas células vivas foi realizado o método de contagem de células viáveis associada à determinação do quantitativo de UFC (Unidades Formadoras de Colônia).

Nos testes realizados para se determinar a viabilidade celular de *Candida intermedia*, os resultados obtidos confirmaram o crescimento dessa levedura no meio seletivo. Assim sendo, nas condições analisadas observou-se o crescimento da levedura, determinando-se, em média, a contagem de UFC igual a $6,2 \times 10^6$ em 48 horas.

Para obtenção de ótimos rendimentos, em relação à produção de enzimas, durante o desenvolvimento dos diferentes tipos de cultivos, 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 (Brumano *et al.*, 1993; Papagianni & Moo-Young, 2001).

A Figura 2 demonstra o desempenho de *Candida intermedia* quando se utilizou diferentes concentrações de inóculo em fermentação submersa. Os resultados mostraram que as maiores atividades proteolíticas (333 U/mL) foram determinadas quando se utilizou inóculo equivalente a 3% do volume de meio e cultura estoque com 24 horas de crescimento no meio sólido (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 inversamente proporcional ao aumento da concentração do inóculo (Figura 2). Outros parâmetros que influenciam no rendimento enzimático são composição do meio, temperatura, o período de incubação e a capacidade de germinação dos esporos (Freire, 1996; Teixeira, 1997).

Nas diferentes condições de cultivo observou-se que as maiores atividades proteolíticas foram obtidas com o inóculo de menor concentração (3%). Esses resultados comprovam que a produção de enzimas de origem microbiana depende

principalmente do próprio microrganismo, visto que nos cultivos tipo "sistema fechado" a concentração de nutrientes, biomassa e os metabólitos alteram constantemente, devido ao metabolismo microbiano (Brumano *et al.*, 1993; Teixeira, 1997; Tucker & Thomas, 1994).

Nos experimentos realizados com o inóculo mais concentrado (10%) nos meios de cultura testados verificou-se que *Candida intermedia* apresentou viabilidade diferenciada, ou seja, menor produção de enzima (Figura 2). Provavelmente, este resultado esteja relacionado com o processo de germinação do esporo, o qual está regulado por estímulos ambientais, pelas propriedades genéticas, fisiológicas e bioquímicas do próprio microrganismo (Griffin, 1994).

Esses resultados corroboram os resultados obtidos por Garcia-Garibay *et al.* (1987), Nampoothiri & Pandey (1995), Papagiannie & Moo-Young (2001), nos quais a atividade enzimática foi diretamente influenciada pela concentração e idade do inóculo. Danesi & Wosiacki (1998), verificaram a influência da quantidade do inóculo utilizando volumes que variaram entre 10 a 25% e obtiveram melhor resposta utilizando o inóculo de menor concentração.

Com relação aos meios usados, nesse experimento, para fermentação comprovou-se que Extrato de Malte foi mais eficiente em relação à Solução de Sais e Caldo de Sabouraud, 34% e 47%, respectivamente. Essa afirmativa está associada às atividades proteolíticas máximas (220 U/mL e 178 U/mL) determinadas em Solução de Sais e Caldo de Sabouraud, respectivamente (Figura 2).

A temperatura constitui um dos mais importantes fatores que influenciam no crescimento e sobrevivência dos organismos. 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).

Nos experimentos realizados para determinar a temperatura ótima de crescimento, *Candida intermedia* demonstrou o crescimento máximo (4,67 mg de biomassa/mL) a 30 °C, em 36 h de fermentação (Figura 3). Essa característica fisiológica determina a classificá-lo como mesofílica. Microrganismos mesofílicos são aqueles que crescem entre 10 °C a 45 °C e tem temperatura ótima de crescimento entre 15 °C a 40 °C (Brock *et al.*, 1994; Deacon, 1997; Griffin, 1994).

De acordo com a Figura 3, *Candida intermedia* não apresentou crescimento típico (fases: de adaptação, exponencial, estacionária e declínio) nas diferentes temperaturas. A ausência da fase de adaptação esta diretamente relacionada com a viabilidade das células do inóculo, isto é, não houve necessidade de resíntese de biocompostos para a levedura iniciar o crescimento (Brock *et al.*, 1994).

Nas temperaturas de 25 °C, 40 °C e 50 °C observou-se que *C. intermedia* expressou as fases exponencial, estacionária e de

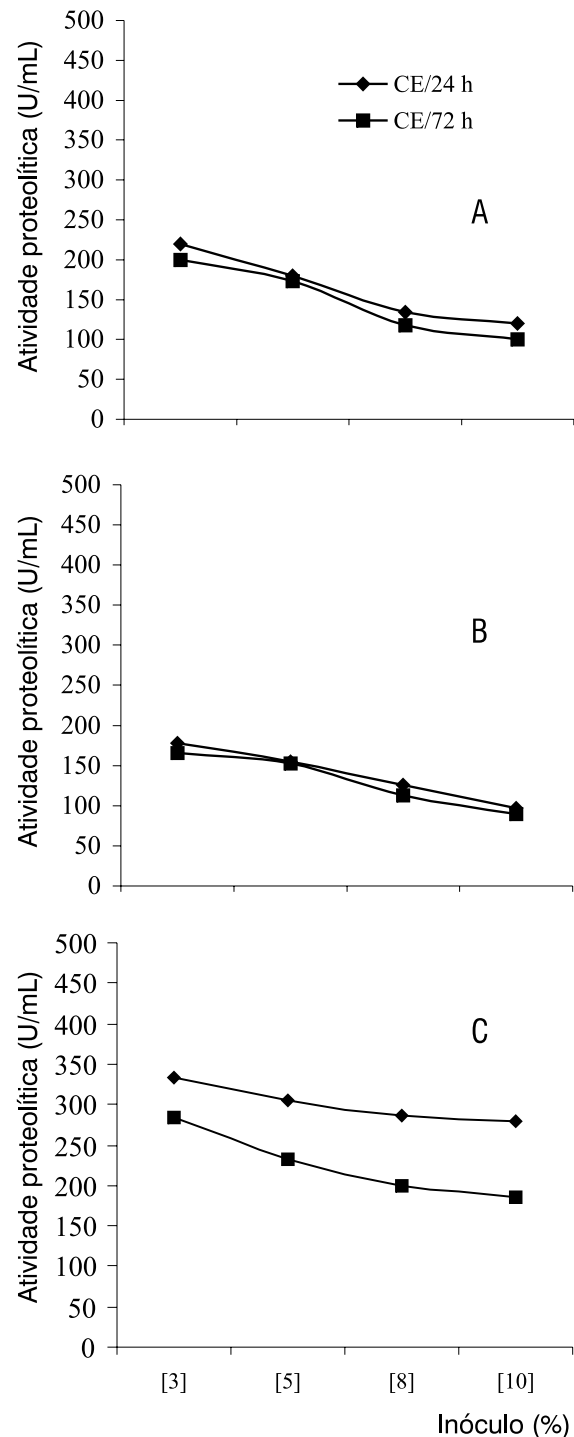


Figura 2 - Influência da concentração do inóculo e da cultura estoque (CE) na produção de proteases por *C. intermedia*, em cultivos obtidos em 40 mL de (A) Solução de sais; (B) Caldo de Sabouraud e (C) Extrato de Malte, mantidos a 30 °C, sob agitação (140 rpm) por 72 horas.

declínio, no entanto, a 30 °C não ocorreu a fase estacionária. Provavelmente essa tendência para o fim do crescimento pode ser atribuída a uma série de circunstâncias, particularmente à exaustão de alguns nutrientes e com menos frequência à produção de compostos tóxicos (Brock *et al.*, 1994).

Comparando o crescimento de *Candida intermedia* apresentado na Figura 3, os resultados mostraram também que a 30 °C foi 7% superior daquele expressado a 25 °C. Quando se avaliou o crescimento dessa levedura a 40 °C e 50 °C identificou-se que houve redução da biomassa equivalente a 21,84% e 33,62%, respectivamente.

O crescimento apresentado por *Candida intermedia* nas diferentes temperaturas está em concordância com as citações de Griffin (1994). Este autor ao discutir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* conclui que as leveduras predominam em baixas temperaturas. Determinadas espécies patogênicas oportunistas, a exemplo de *Candida albicans*, são adaptadas ao crescimento a 37 °C.

A temperatura constitui outro parâmetro crítico que influencia na produção de enzima, precisa ser controlado e varia de organismo para organismo (Chaloupka, 1985). Na Figura 4 estão os resultados da produção de proteases em diferentes temperaturas (25 °C, 30 °C, 40 °C e 50 °C). Observou-se que as atividades proteolíticas foram detectadas desde o início do processo de fermentação em todos os ensaios.

A máxima atividade proteolítica (356 U/mL), nas diferentes temperaturas, foi determinada no extrato bruto *C. intermedia* a 30 °C (Figura 4). Estes resultados estão de acordo com as citações de Chantawannakul *et al.* (2002), Kanekar *et al.* (2002), Petinate *et al.* (1999), Yang & Lin (1998) e Yang *et al.* (1999).

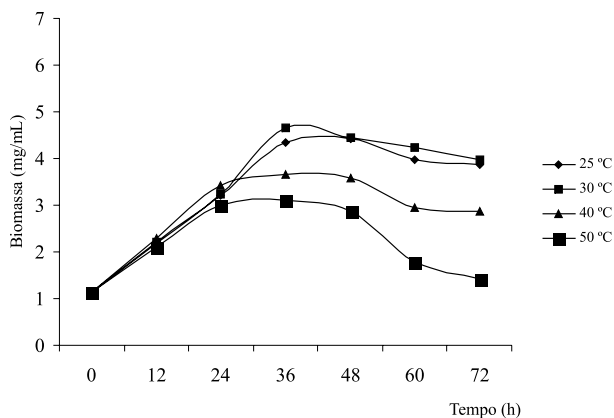


Figura 3 - Temperatura ótima de crescimento relacionada ao peso seco da biomassa produzida por *Candida intermedia*, em Extrato de Malte, suplementado com gelatina 1%, mantidos sob agitação (140 rpm), durante 72 horas.

Verificou-se ainda que os menores níveis de protease nas culturas de *Candida intermedia* ocorreram a 50 °C demonstrando atividade máxima de 233 U/mL, em 48 horas de fermentação. Este quantitativo proteolítico corresponde a um decréscimo de 34,5% quando comparado ao nível máximo da produção da enzima a 30 °C.

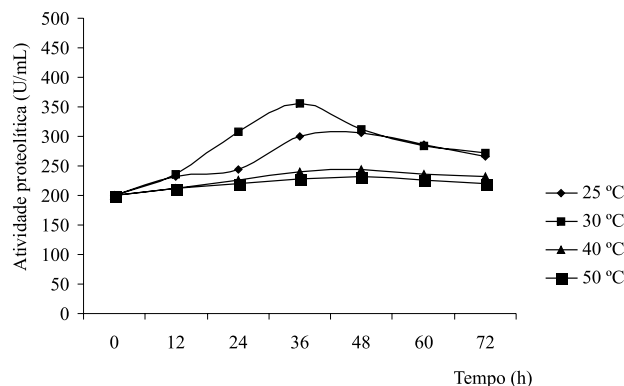


Figura 4 - Temperatura ótima de crescimento relacionada à produção de protease por *Candida intermedia*, em Extrato de Malte, suplementado com gelatina 1%, mantidos sob agitação (140 rpm), durante 72 horas.

CONCLUSÕES

Entre as leveduras isoladas na Região Amazônica, as espécies mais frequentes foram *Candida aquatica* e *Candida tropicalis*. Nas análises quantitativas e qualitativas a maioria das leveduras produziu protease, entre estas *Candida intermedia* foi a espécie que expressou maior atividade proteolítica.

C. intermedia não apresentou características de patogenicidade e as condições de fermentação que proporcionaram maior produção de protease foram: temperatura de 30 °C e inóculo equivalente a 3% do volume do meio (Extrato de Malte e gelatina 1%) utilizando cultura estoque com 24 horas de crescimento em ágar Malte.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Ammerer, G.; Hunter, C. P.; Rothman, J. H.; Saari, G. C.; Valls, L. A.; Stevens, T. M. 1986. PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors. *Mol. Cell. Biol.*, (6): 2490- 2497.
- Aoki, S.; Ito-kuwa, S.; Nakamura, K.; Kato, J.; Ninomiya, K.; Vidotto, V. 1994. Extracellular proteolytic activity of *Cryptococcus neoformans*. *Mycopathologia*, (128): 143- 150.
- Barnett, J. A.; Payne, R. W.; Yarrow, D. 1990. *Yeast Characteristics and Identification*. 2nd ed. Cambridge: University Press, Cambridge. 1200 pp.
- Becker, J. M.; Caldwell, G. A.; Zachgo, E. A. 1996. *Biotechnology: a laboratory course*. 2nd ed. Academic Press, London. 261pp.
- Braga, A. A. *Seleção de leveduras produtoras de proteinases extracelulares*. 1997. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 71 pp.

- Braga, A. A.; Morais, P. B.; Linardi, V. R. 1998. Screening of yeasts from Brazilian Amazon rain forest for extracellular proteinase production. *Systematic and Applied Microbiology*, (21): 353-359.
- Brock, T. D.; Madigan M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Biology of Microorganisms*. 1994. 7th. Prentice-Hall International, Inc., New York. 909pp.
- Brumano, M. H. N., Coelho, J. L. C.; Araújo, E. F.; Silva, D. O. 1993. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. *Microbiol. Biotechnol.*, (9): 225-228.
- Callegari-Jacques. 2003. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Artmed, Porto Alegre, 256pp.
- Chaloupka, J. 1985. Temperature as a factor regulating the synthesis of microbial enzymes. *Microbio. Sci.*, (2): 86-90.
- Chantawannakul, P.; Oncharoen, A.; Klanbut, K.; Chukeatirote, E.; Lumyong, S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand. *Science Asia*, (28): 241-245.
- Danesi, E. D.G.; Wosiacki, G. 1998. Otimização da produção de nata (celulose bacteriana) por fermentação em superfície. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 18 (1): 131-139.
- Deacon, J. W. 1997. *Modern micology*. Blackwell Science, Oxford. 303pp.
- Dosoretz, C. G.; Chen, H. C.; Grethlein, H. E. 1990. Effect of Environmental Conditions on Extracellular Protease Activity in Lignolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 56 (2): 395-400.
- Fisher, F.; Cook, N. H. 1998. *Fundamentals of Diagnostic Mycology*. WB Saunders Co., Totowa-NJ. 352 pp.
- Frankena, J.; Koningsstein, G. M.; van Verseveld, H. W.; Stouthamer, A. H. 1986. Effect of different limitations in chemostat cultures on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, (24): 106-112.
- Freire, D. M. G. *Seleção de microorganismos lipolíticos e estudo da produção de lipase por Penicillium restrictum*. 1996. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 174pp.
- Fungaro, M. H. P.; Fungaro, M. H. P.; Souza JR, C.L.; Pizzirani-Kleiner, A. A.; Azevedo, J. A. 1994. Recurrent mutation selection to improve rennet production in *Candida tsukubaensis*. *Revista Brasileira de Genética*, (17): 377-382.
- García-Garibay, M.; Gomes-Ruiz, L.; Bárzana, E. 1987. Studies on the simultaneous production of a single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Biotechnology Letters*, (9): 6411-416.
- Godfrey, T.; West, S. 1996. *Industrial enzymology*, 2nd ed. Macmillan Publishers Inc, New York, N.Y. 73pp.
- Griffin, D. H. 1994. *Fungal physiology*. 2nd ed. Wiley-Liss, NY. 458pp.
- Kanekar, P. P.; Nilegoankar, S. S.; Sarnaik, A. S.; Kellar, A. S. 2002. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline lake in India. *Bioresource Technology*, (85): 87-93.
- Kirsop, B. E.; Kurtzman, C. P. 1988. *Yeast*. Cambridge University Press, Cambridge. 233 pp.
- Kreger-Van Rij, N. I. W. 1984. *The yeast: a taxonomic study*. 3th ed. Elsevier Sci. Public, Amsterdam. 1503 pp.
- Kudrya, V.; A.; Simonenko, J. A. 1994. Alkaline serine proteinase and lection isolation from cultura of *Bacillus subtilis*. *Applied microbial Biotechnology*. Abstrat-EMBASE, 233-236 p.
- Leighton, T. J.; Doi, R. H.; Warren, R.A. J.; Kelln, R. A. 1973. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, (76): 103-122.
- Lodder, J. 1984. *The yeast - Taxonomic study*. 2nd ed. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. 1002 pp.
- Macdonald, F.; Odds, F. C. 1980. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidiasis. *Journal of Medical Microbiology*. (13): 423 - 435.
- Mendes-Giannini, M. J. S.; Ricci, R. A.; Hanna, S.A.; Salina, M. A. 1997. Fatores envolvidos na patogênese fúngica. *Revista Ciências Farmacêuticas*, 18 (2): 207-229.
- Midgley, G.; Hay, J. R.; Clayton, Y.M. 1998. *Diagnóstico em cores micologia médica*. Editora Manole, São Paulo-SP. 155pp.
- Nampoothiri, K. M.; Pandey, A. 1995. Glutamic acid fermentation *Brevibacterium* DSM 20411. *J. Food Sci. Technol.*, 32 (5): 406-408.
- Nunes, T. A. 1998. *Espécies de Cladosporium de interesse médico isoladas de solo e de vegetais de áreas de lazer da cidade do Recife, PE, Brasil*. Dissertação (Mestrado). Recife-PE. 69pp.
- Ogrydziak, D. M. 1993. Yeast extracellular proteases. *Crit. Rev. Biotechnol.*, (13): 1-55.
- Papagianni, M.; Moo-Young, M. 2002. Protease secretion in glucomylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry*, (37): 1271-1278.
- Petinate, S. D. G.; Martins, R. M.; Coelho, R. R. R.; Meirelles, M. N. L.; Branquinha, M. H.; Vermelho, A. B. 1999. Influence of growth medium in proteinase and pigment production by *Streptomyces cyaneus*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 (2): 173-177.
- 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*. (60): 115-122.
- Price, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. 1982. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*. (20): 7-14.
- Rodrigues, A. N.; Sant'Anna, E. S. 2001. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 21 (1): 63-66.
- Shimizu, K.; Kondoh, Y.; Nojiri, K. 1987. Proteinase production and pathogenicity of *Candida albicans*. *Microbiol. Immunol.*, 31 (11): 1045-1060.
- 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: 4^o Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática. Resumos. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 98pp.

- Stanbury, F. P.; Whitaker, A. 1984. *Principles of fermentation technology*. 1st. ed. Pergamon Press, Oxford. 255pp.
- Teixeira, M. F. S.; Fernandes, O. C. C.; Herrera, A. M.; Durán, N. 1996. Determinação qualitativa de proteases: método de *cup-plate* modificado. *Rev. UFAM. Série: Ciências da Saúde*, 4/5 (1/2): 39-45.
- Teixeira, M. F. S. 1997. *Otimização da produção de enzimas pectinolíticas por Aspergillus japonicum* 586. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 152pp.
- Togni, G. D.; Sanglard, R.; Falchetto, R.; Monod, M. 1991. Isolation and nucleotide sequence of the extracellular acid protease gene (ACP) from yeast *Candida tropicalis*. *FEBS Lett.*, (286): 181-185.
- Tornai-Lehoczki, J. ; Péter, G. ; Dlačny , D. 2003. CHROMagar *Candida* medium as a practical tool for the differentiation and presumptive identification of yeast species isolated from salads. *Inter. J. of Food Microbiology*, (86): 189-200.
- Tucker, K. G.; Thomas, C. R. 1994. Inoculum effects on fungal morphology: shake flasks vs agitated bioreactors. *Biotechn. Techn.*, (8): 153- 156.
- Vermelho, A. B., Meirelles, M. N. L.; Lopes, A.; Petinate, S. D. G.; Chaia, A. A.; Branquinha, M. H. 1996. Detection of extracellular proteases from microorganisms on agar plates. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91(6): 755-760.
- Woolford, C. A.; Daniels, L. B.; Park, F. J.; Jones, E. W.; Van Arsdell, J. N.; Innis, M. A. 1989. The PEP4 gene encodes an aspartyl protease implicated in the post-translational regulation of *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.*, (6): 2500- 2510.
- Yamamoto, T.; Yamamoto, T.; Nohara, K.; Uchida, K.; Yamaguchi, H. 1992. Purification and characterization of secretory proteinase of *Candida albicans*. *Microbiology and Immunology*. 36 (6): 637 – 641.
- Yamashita, L. D.; Ilirata, D.; Machida, M.; Fukui, S. 1986. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of the secretable acid protease gene from *Saccharomycopsis fibuligera*. *Agric. Biol. Chem.*, (50): 109- 113.
- Yang, F.; Lin, I. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, (23): 397- 402.
- Yang, J.; Shih, I.; Tzeng , Y.; Wang , S. 2000. Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme and Microbial Technology*, (26): 406- 413.

Recebido em 23/04/2004

Aceito em 04/05/2006