

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

**VALESCA WEINGARTNER MONTIBELLER**

**MANANASE:  
PRODUÇÃO POR VIA CONVENCIONAL E RECOMBINANTE  
E OBTENÇÃO DE PRODUTO FORMULADO LÍQUIDO**

**CURITIBA**

**2015**

**VALESCA WEINGARTNER MONTIBELLER**

**MANANASE:  
PRODUÇÃO POR VIA CONVENCIONAL E RECOMBINANTE  
E OBTENÇÃO DE PRODUTO FORMULADO LÍQUIDO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Área de Concentração em Agroindústria e Biocombustíveis, Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana Porto Souza  
Vandenberghe

Co-orientadores:  
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol

**CURITIBA**

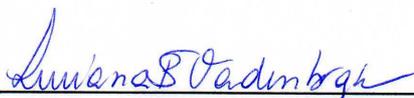
**2015**

## TERMO DE APROVAÇÃO

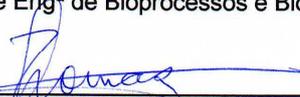
VALESCA WEINGARTNER MONTIBELLER

MANANASE: PRODUÇÃO POR VIA CONVENCIONAL E RECOMBINANTE E  
OBTENÇÃO DO PRODUTO FORMULADO LÍQUIDO

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:



Profª. Dra. Luciana Porto de Souza Wandenbergh  
Orientadora – Departamento de Eng<sup>a</sup> de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR



Profª Drª Vanete Thomaz Soccol  
Co-orientadora - Departamento de Eng<sup>a</sup> de Bioprocessos e Biotecnologia,  
UFPR



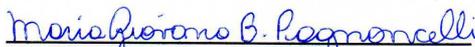
Profª Drª Adriane Bianchi Pedroni Medeiros  
Departamento de Eng<sup>a</sup> de Bioprocessos e Biotecnologia, UFPR



Prof. Dr. Gustavo Henrique Couto  
Departamento de Química e Biologia, UTFPR



Profª Drª Giselle Maria Maciel  
Departamento de Química e Biologia, UTFPR



Profª Drª Maria Giovana Binder Pagnoncelli  
Departamento de Farmácia, UFRN

Curitiba, 15 de Junho 2015.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por toda proteção e bênçãos derramadas sobre mim e minha família e à Nossa Senhora pela intervenção junto ao Pai, especialmente nos momentos adversos.

À orientadora deste trabalho, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciana P. S. Vandenberghe, pela oportunidade, educação, confiança em mim depositada e por todos os ensinamentos e esforços na aquisição dos materiais necessários à realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela atenção, palavras de incentivo e oportunidades a mim concedidas.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanete Thomaz Soccol, toda minha admiração e gratidão. Ao colaborar com este trabalho, a Sra. fez muito mais.... Nada do que eu escrever aqui conseguirá dimensionar o tamanho do seu feito, afinal, um gesto vale mais que mil palavras!

À banca avaliadora desta Tese: professores Gustavo Henrique Couto, Giselle Maria Maciel, Maria Giovana Binder Pagnocelli e Adriane Pedroni Medeiros, pelo tempo dedicado às correções e importante contribuição.

À minha família, minha mãe Elisabet, pela vida, educação, apoio financeiro, psicológico e amor incondicional... Eu não poderia ter melhor mãe nesse mundo; À minha avó Irma, por sua existência na minha vida... Não seria nem metade do que sou sem a Sra. e também não teria a mesma força para superar as dificuldades; Ao meu amor maior do mundo, Régis. Como costumamos dizer, o que seria de mim sem você? Eu certamente sou mais feliz, mais completa e mais humana com você! Obrigada pelo apoio financeiro, paciência, incentivo, força, por aceitar minha ausência e compartilhar das muitas horas até tarde e fins-de-semana no laboratório. Vocês três são minha base, meu porto seguro e minha inspiração!

Ao meu tio Márcio, por amparar minha mãe e minha avó na minha ausência. Tudo fica mais fácil na vida com um tio exemplar como você!

Às minhas amigas, companheiras de bancada e de vida, Francieli D. E. Goelzer e Denise N. X. Salmon. Vocês foram peças chave para que a minha engrenagem funcionasse e eu pudesse chegar até aqui... Obrigada por tuuuuuudo!

À Cristine Rodrigues pelo companheirismo diário e inúmeros materiais emprestados para a realização deste projeto.

Aos amigos e colegas que tornaram essa empreitada mais doce e divertida: Daniel Goyzueta, Aline K. S. Pasquali, Paulo C. Kirnev, Ricardo Frendrich, Márcia Wibrantz, Jefferson Costa, Sidnei E. Bordignon Jr., Giselli Torres, Marcelo Adriano, Elisa Mara, Lucas, Anna Carolina da Silva, Mário C. Bier, Nelson Libardi, Adriano P. Monteiro, Suzan C. Rossi, Keli Sobral, Ana Maria Finco, Maria Rosa P. Machado, Mitiyo F. Miyaoka, Mara Eli de Matos, Michelle C. T. Batista, Francisco Vítola, Evaldo Carlos Silva, Tarcila Buueno, Lúgia Barizon, Sajna e Lalitha Gottumukkala

Aos colegas engenheiros de bioprocessos e biotecnologia, Juliana de Oliveira, Ryu Masaki, Eduardo Sydney e Guilherme Moraes pelo auxílio com os biorreatores.

Às estagiárias que muito colaboraram com este trabalho durante 4 anos, Fernanda M. Kashiwagi, Julia C. Silvestrini dos Santos, Viviane H. Oshima e Luciana Oliveira.

Às professoras Dr.<sup>a</sup> Susan Karp e Dr.<sup>a</sup> Michele Rigon Spier pela oportunidade em participar de estágio internacional no projeto “BIOASORT” desenvolvido na Università Degli Studi di Napoli Federico II (Itália). Agradeço também a receptividade e carinho do chefe do departamento de biotecnologia da UNINA, Prof. Dr. Giovanni Sania; À coordenadora do BIOASORT, Dr.<sup>a</sup> Vincenza Faraco, toda sua equipe e em especial à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leila Birollo e Roberto Vinciguerra, pelo auxílio em alguns experimentos. Aos colegas Simona Giacobbe, Annabel Serpico, Rossana Liguori, Gemma Macellaro, Lucia Guarino, Sara De Matola, Mena Sannino, Fortunato P. Esposito, Sara e Eugenio Galano, Don Alfredo M. Gravagnuolo e Antonela Amore e sua família, pela acolhida nas datas comemorativas.

À equipe do Hostel Mergellina que me abrigou durante seis meses longe de casa, em especial, Nando, Gino, Giulio, Sabina, Totó e Pierino. Ao companheirismo de Mr. Alan Smith e à amizade, carinho e proteção de Giuseppe Nuara.

À Silvana Maria Alban, Thaísa Scheuer e Natalia Meza Ramírez, pela amizade e auxílio na realização dos inúmeros experimentos de biologia molecular.

Ao colega Celso Fávaro Júnior, por toda a sua dedicação e empenho em realizar etapas cruciais deste trabalho. Seu jeito de ser e agir será um exemplo que seguirei por toda minha vida! Agradeço também à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana F. Mercadante e o chefe do Laboratório de Neurobiologia, Prof. Dr. Sílvio Marques Zanata, pela recepção e disponibilidade da infra-estrutura, material e equipamentos necessários a diversos experimentos.

À equipe do Laboratório Multi-usuário do Departamento de Bioquímica da UFPR, pela análise de sequenciamento genético do plasmídeo recombinante.

Ao Sr. Paulo, vidreiro da UFPR, pelos materiais criados especialmente para o desenvolvimento deste trabalho e, a todos os fornecedores de material de pesquisa, em especial à Vera, Milton e Luiz Carlos, sempre prontos a atender nossos pedidos urgentes.

Aos colegas André Luís L. da Silva e André Luiz Gollo pelo auxílio nos experimentos de toxicidade da formulação líquida de mananase.

À todos os colegas e professores do Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia: Dr.<sup>a</sup> Adriane B. P. Medeiros, Dr. Júlio César de Carvalho, Dr. Luiz A. Júnior Letti e Dr.<sup>a</sup> Adenise L. Woiciechowski

Aos meus cunhados, Fernando Montibeller (*in memoriam*), Juliana Montibeller, Eduardo C. Q. dos Santos e sogros, Isaías e Maria Teresinha Montibeller... É um orgulho fazer parte desta família! Obrigada por todas as palavras de apoio, incentivo e pelo bom humor cotidiano que espalha alegria e leveza por onde passa.

Aos queridos Michele C. de Paula, Tulio Quintino dos Santos, Bernardete e William H. Pruett, D. Judi e Sr. Romeu, pelas palavras de incentivo e carinho sincero!

Aos eternos amigos Marina Walendowsky, Gabriele Volpato, Juliana M. S. Gianolla, Jarlei Fiamoncini, Bianca A. Pereira, Carla S. Silva, Fernando Polidório, Marcus V. Máximo, Juliana Gaboardi e Aline Lúcia Vieira, pela torcida de sempre e presença mesmo à distância.

Ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) na forma de bolsa do Programa Demanda Social (DS).

A todos que contribuíram de alguma forma para a conclusão deste doutorado, muito obrigada!

## RESUMO

As mananases são enzimas aplicadas nos mais diversos segmentos industriais devido à sua capacidade de decompor as cadeias de mananas, presentes na fração hemicelulósica da parede celular vegetal. São produzidas comercialmente por fermentação submersa (FSm) e também estudadas à partir da fermentação no estado sólido (FES) porém, são desconhecidos relatos que abordam sua produção à partir da fermentação semissólida (FESS). A técnica de FESS é uma alternativa para o escalonamento de processos com o emprego de biorreatores, pois une importantes características da FES e da FSm, como por exemplo, o emprego de subprodutos agroindustriais como substratos sólidos e a simplificada recuperação do produto final. Os principais objetivos deste trabalho foram investigar a produção de mananase por via convencional utilizando diferentes técnicas fermentativas (FES, FESS e FSm) e por via recombinante (expressão heteróloga), bem como avaliar a estabilidade do extrato enzimático após o uso de diferentes aditivos, para composição da formulação líquida de mananase. Para tanto, foi realizada seleção de subprodutos agroindustriais para seu emprego como substratos nos processos de FES e FESS, que visaram a produção de mananases por via convencional com o fungo filamentoso *Aspergillus niger* NRRL 328. A casca de soja (CS) foi o substrato mais eficiente para emprego em processos de FESS, o qual se mostrou viável para produção da mananase ( $76,86 \text{ U mL}^{-1}$ ). O aumento da escala produtiva de mananases por FESS foi explorada em biorreatores do tipo Tanque Agitado (STR) e Coluna de Bolhas (BCR), sendo este último, o modelo que apresentou a melhor resposta ( $30,02 \text{ U mL}^{-1}$ ). A produção de mananases por via recombinante foi realizada com sucesso quanto à clonagem, obtenção do plasmídeo recombinante e expressão heteróloga pela levedura *Pichia pastoris* GS115, com índice superior à mananase nativa proveniente da cepa parental *A. niger*, em condições fermentativas similares. A análise quantitativa aliada ao perfil protéico obtido por SDS-PAGE, revelaram que a mananase recombinante não foi totalmente secretada pela levedura e que sua expressão pode ser melhorada. A formulação líquida de mananases, avaliada quanto à sua estabilidade pela ação de diferentes aditivos e também quanto à sua toxicidade ao organismo teste *Artemia salina* ( $CL_{50}$ ), teve sua composição considerada ideal na presença do extrato mananolítico semi-purificado, acrescido de citrato de sódio (0,15%), glicerol (2,5 M) e EDTA (0,01%), com comprovada estabilidade da mananase (99%), sob condição acelerada de armazenamento ( $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 15 dias). A mesma formulação, na faixa de concentração entre 1 e 1,35%, não apresentou toxicidade ( $CL_{50}$ ) para *A. salina*. No estudo de estabilidade normal, o armazenamento à  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  do extrato mananolítico semi-purificado na ausência de aditivos, impediu a contaminação microbiana e manteve 90% da atividade enzimática durante 120 dias. O desenvolvimento deste trabalho correspondeu às expectativas uma vez que possibilitou avanços importantes acerca da produção de mananases por via convencional e recombinante, bem como a obtenção de produto com bio-atividade e estabilidade comprovadas.

Palavras-chave: Mananase, Fermentação Semissólida, Cascas de Soja, Biorreatores, Formulação Líquida, Expressão Heteróloga.

## ABSTRACT

Mannanases are enzymes applied in the most several industrial segments, due its capacity to breaking down mannan chains, founded in the hemicelulosic portion of plant cell wall. Comercially produced by submerged fermentation (SmF) and also studied from solid-state fermentation (SSF), the report from production using semi-solid-state fermentation (SSSF) are unknow. The semi-solid-state fermentation technique is an alternative for process scale-up employing bioreactors since it combines important features of SSF and SmF, e.g. the use of agroindustrial by-products as solid substrates and the simplified recovery of the final product. The main objectives of this work were to investigate the mannanase production by conventional way using different fermentative techniques (SSF, SmF and SSSF) and by recombinant way (heterologous expression), as well as, evaluate the stability of the enzyme extract by studying different additives, which were added to a liquid mananase-based formulation. For this, the screening of several agroindustrial by-products was carried out to test them as solid substrate in the SSF and SSSF processes for mannanase production by conventional way with the filamentous fungus *Aspergillus niger* NRRL 328. Soybean husks (SH) was the most efficient substrate for mannanase production by SSSF processes (76.86 U mL<sup>-1</sup>). Mannanase production scale up by SSSF was exploited in Stirred Tank (STR) and Bubble Column (BCR) bioreactors. STR promoted a better response (30.02 U mL<sup>-1</sup>). Recombinant mannanase production was conducted success fully in respect to cloning, recombinant plasmimid achieving and heterologous expression by the yeast *Pichia pastoris* GS115. Superior rates of mannanase production were achieved in comparison to native mannanase from parental strain *A. niger* in similar fermentative conditions. Quantitative analyzes, combined to the protein profile obtained by SDS-PAGE, revealed that the recombinant mannanase was not totally secreted by the yeast and the expression could be improved. The liquid mannanase formulation, evaluated with respect to its stability by the action of several additives and also its toxicity for the organism test *Artemia salina* (LC<sub>50</sub>), was composed by the mannanolytic semi-purified extract addicted of sodium citrate (0.15%), glycerol (2.5 M) and EDTA (0.01%). The formulation showed a mannanase stability of 99%, under accelerated storage conditions (50 °C during 15 days). The same formulation in the concentration range between 1 and 1.35%, did not show toxicity (LC<sub>50</sub>) for *A.salina*. In the normal stability study, the storage at 4 °C of the pre-purified mannanolytic extract, without additives, did not show microbial contaminations with 90% of enzymatic activity stability during 120 days. The development of this work allowed important advances concerning mannanases production by conventional and recombinant way, as well as, the definition of a mannanase-based product with proven bio-activity and stability.

Key-words: Mannanase, Semi-solid-state Fermentation, Soybean Husks, Bioreactors, Liquid Formulation, Heterologous Expression.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA DE FIBRA VEGETAL .....	26
FIGURA 2 - ESTRUTURAS ILUSTRATIVAS DE DIFERENTES FORMAS DE MANANAS E AS ENZIMAS REQUERIDAS PARA SUA HIDRÓLISE. MANANA LINEAR (A), GALACTOMANANA RAMIFICADA(C), GLUCOMANANA LINEAR (D), E GALACTOGLUCOMANANA RAMIFICADA (F). A ESTRUTURA DA MANANA É HIDROLIZADA POR $\beta$ -MANANASE, AO PASSO QUE $\alpha$ -GALACTOSIDASE E ACETIL MANANA ESTERASE LIBERAM GALACTOSE E GRUPOS ACETIL RESPECTIVAMENTE. OS PRODUTOS GERADOS PELA AÇÃO DA $\beta$ -MANANASE, MANOSE (B) E GLICOMANOSE (E), SÃO EM SEGUIDA HIDROLIZADOS POR $\beta$ -MANOSIDASE E $\beta$ -GLICOSIDASE PARA FINALMENTE GERAREM MONOSSACARÍDEOS DE MANOSE, GLICOSE E GALACTOSE .....	27
FIGURA 3 – APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS HIDROLASES .....	29
FIGURA 4 – A) <i>Aspergillus niger</i> EM PLACA DE PETRI CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CZAPECK DOX B) <i>Aspergillus niger</i> VISUALIZADO SOB MICROSCÓPIO ÓPTICO .....	31
FIGURA 5 - EXTRATO ENZIMÁTICO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM <i>A. niger</i> NRRL 328, ANALIZADO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA .....	37
FIGURA 6 – A) <i>Pichia pastoris</i> EM PLACA DE PETRI CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA YPD B) <i>Pichia pastoris</i> VISUALIZADA SOB MICROSCOPIA.....	39
FIGURA 7 - MAPA DA INTEGRAÇÃO DE GENE HETERÓLOGO NO GENOMA DE <i>P. pastoris</i> . (A) INTEGRAÇÃO DE CÓPIA SIMPLES; (B) INTEGRAÇÃO DE CÓPIAS MÚLTIPLAS .....	42
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA CONVENCIONAL ( <i>A. niger</i> NRRL 328) .....	51
FIGURA 9 – BIORREATOR MODELO MDL 750 (B. E. MARUBISHI THAILAND Co. Ltda.), UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS .....	57
FIGURA 10 – A) BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS PROJETADO NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA B) PROJETO DO BIORREATOR DE 1,5 L COM RESPECTIVAS MEDIDAS.....	58

FIGURA 11 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE (EXPRESSÃO HETERÓLOGA COM <i>P. pastoris</i> GS115).....	61
FIGURA 12 - DIAGRAMA DO PLASMÍDEO pPICZ $\alpha$ A.....	67
FIGURA 13 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NOS ESTUDOS DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE MANANASE .....	83
FIGURA 14 – A) CICLO DE VIDA DA <i>Artemia salina</i> B) CISTOS EM ECLOSÃO E FASE LARVAL (NAUPLIOS) DE <i>Artemia salina</i> .....	88
FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES EM FRASCOS ERLLENMEYER, UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS .....	90
FIGURA 16 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER, UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS COMO SUBSTRATO (5%, m/v) .....	92
FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER, UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS COMO SUBSTRATO (10%, m/v) .....	93
FIGURA 18 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (5%, m/v) EM FRASCOS ERLLENMEYER .....	95
FIGURA 19 – INFLUÊNCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (5%, m/v) .....	96
FIGURA 20 – INFLUÊNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE CS NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS (5%, m/v) .....	97
FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER .....	99
FIGURA 22 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (2,5%, m/v) EM BIORREATOR STR. DESTAQUE PARA O CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO <i>A. niger</i> NRRL 328.....	102
FIGURA 23 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (15%, m/v) E <i>A. niger</i> NRRL 328 EM BIORREATOR BCR.....	104
FIGURA 24 – GRÁFICO DE CONTORNO PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E INDUTOR (LBG) PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FS <sub>m</sub> .....	106

FIGURA 25 - FUNGO <i>A. niger</i> NRRL 328 CULTIVADO EM MEIO SINTÉTICO POR FSm PARA PRODUÇÃO DE MANANASE.....	108
FIGURA 26 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE MANANASE POR <i>A. niger</i> NRRL 28 (CEPA PARENTAL) EM FSm COM MEIO SINTÉTICO EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	108
FIGURA 27 – PRODUTOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE 1,5%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™).....	110
FIGURA 28 – PRODUTOS DA DIGESTÃO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>Eco</i> RI E <i>Xba</i> I. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™).....	112
FIGURA 29 – DNA EXTRAÍDO DAS COLÔNIAS DE <i>E. coli</i> DH5α TRANSFORMADAS COM OS PLASMÍDEOS VAZIO E RECOMBINANTE. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™).....	113
FIGURA 30 – PLASMÍDEOS RECOMBINANTES DUPLAMENTE DIGERIDOS PELAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO <i>Eco</i> RI E <i>Xba</i> I. GEL DE AGAROSE 1%, %, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™).....	114
FIGURA 31 – SEQUÊNCIA EXPORTADA DA AMOSTRA 34308.ab1 (INSERTO DA COLÔNIA 3) ESTENDIDA COM O <i>PRIMER FORWARD</i> E ALINHADA COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA XM_001390670.1. EM <b>NEGRITO E SUBLINHADO</b> , A SEQUÊNCIA RECONHECIDA PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Eco</i> RI.....	115
FIGURA 32 – SEQUÊNCIA EXPORTADA DA AMOSTRA 34307.ab1 (INSERTO DA COLÔNIA 3) ESTENDIDA COM O <i>PRIMER REVERSE</i> E ALINHADA COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA XM_001390670.1. EM <b>NEGRITO E SUBLINHADO</b> , A SEQUÊNCIA RECONHECIDA PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Xba</i> I.....	115
FIGURA 33 – PLASMÍDEOS pPICZα A (VAZIO E RECOMBINANTE) CIRCULARES OU LINEARIZADOS PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Sac</i> I. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR LAMBA-HIND III (THERMO SCIENTIFIC).....	116
FIGURA 34 – A) CONTROLE NEGATIVO DO MEIO DE CULTURA E LEVEDURA ( <i>P. pastoris</i> GS115 CULTIVADA EM YPDS/ZEOCINA100 µg/mL); B) <i>P. pastoris</i> GS115 TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO VAZIO; C) <i>P. pastoris</i> GS115 TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO RECOMBINANTE.....	117
FIGURA 35 – SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> GS115 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE.....	119

FIGURA 36 – SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> GS115 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE .....	120
FIGURA 37 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA MANANASE RECOMBINANTE COM TRÊS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR POR <i>P. pastoris</i> GS115 .....	122
FIGURA 38 – CINÉTICA (20 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1, 3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR <i>P. pastoris</i> .....	124
FIGURA 39 – CINÉTICA (30 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1, 3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR <i>P. pastoris</i> .....	124
FIGURA 40 – CINÉTICA (20 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR <i>P. pastoris</i> .....	126
FIGURA 41 – CINÉTICA (30 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR <i>P. pastoris</i> .....	126
FIGURA 42 - SDS-PAGE DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE <i>P. pastoris</i> . CINÉTICA DA FSm EM CALDO BMMY COM SORBITOL 5% (m/v) A 20 E 30 °C .....	127
FIGURA 43 – MÉDIA DE ATIVIDADE RESIDUAL DE MANANASE (%) EM CADA UMA DAS ETAPAS DE SEPARAÇÃO REALIZADAS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO MANANOLÍTICO SEMI-PURIFICADO.....	130
FIGURA 44 – ESTABILIDADE ACELERADA (FASE 1): ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE PARA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE ARMAZENADA A 50 °C DURANTE 15 DIAS A) EFEITO DA MAIOR CONCENTRAÇÃO (m/v); B) EFEITO DA MENOR CONCENTRAÇÃO (m/v).....	133
FIGURA 45 – ESTABILIDADE ACELERADA (FASE 1): ADITIVOS SELECIONADOS ESTUDADOS EM CONJUNTOS PARA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE ARMAZENADA A 50 °C DURANTE 15 DIAS.....	136

FIGURA 46 – ESTABILIDADE NORMAL (FASE 2): ATIVIDADE RESIDUAL DE MANANASE (%) NO ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA ARMAZENADA EM TEMPERATURA AMBIENTE E SOB REFRIGERAÇÃO (4 °C) POR 120 DIAS .....	137
FIGURA 47 – INATIVAÇÃO TÉRMICA (50 E 60 °C) DA MANANASE (EXTRATO SEMI-PURIFICADO) .....	139
FIGURA 48 – PERFIL DE ATIVIDADE DA ENZIMA MANANASE (EXTRATO SEMI-PURIFICADO) A 50 E 60 °C EM RELAÇÃO AO TEMPO (MINUTOS) .....	139
FIGURA 49 – ESTUDO DE TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL LÍQUIDA DE MANANASE, REALIZADO COM O MICROCRUSTÁCEO A. <i>salina</i> .....	141

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EXEMPLOS DE APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DA MANANASE .....	28
TABELA 2 - PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA CONVENCIONAL UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE FSm E FES .....	34
TABELA 3 - PROMOTORES UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>P. pastoris</i> .....	43
TABELA 4 - PESQUISAS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE MANANASE RECOMBINANTE .....	44
TABELA 5 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DA TAXA DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS .....	57
TABELA 6 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm.....	60
TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO MEIO BASAL .....	62
TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO CALDO CZAPEK EXTRATO DE LEVEDURA.....	63
TABELA 9 – PRIMERS SINTETIZADOS PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE .....	64
TABELA 10 – REAÇÃO DE PCR PARA SÍNTESE DO cDNA .....	65
TABELA 11 - PARÂMETROS DE TERMOCICLAGEM UTILIZADOS NA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA.....	65
TABELA 12 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR (cDNA) COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>EcoRI</i> .....	68
TABELA 13 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pPICZ $\alpha$ A COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>EcoRI</i> .....	68
TABELA 14 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR (cDNA) COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Xba I</i> .....	69
TABELA 15 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pPICZ $\alpha$ A COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO <i>Xba I</i> .....	69
TABELA 16 - REAÇÃO PARA UNIÃO DO INSERTO DE INTERESSE NO VETOR ESCOLHIDO (pPICZ $\alpha$ A).....	70

TABELA 17 - MEIO DE CULTURA <i>LOW SALT LB</i> .....	70
TABELA 18 - TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO.....	72
TABELA 19 - DIGESTÃO DUPLA DOS PLASMÍDEOS EXTRAÍDOS .....	73
TABELA 20 - REAÇÃO DO DNA POR BIGDYE® TERMINATOR V3.1 READY REACTION CYCLE SEQUENCING.....	74
TABELA 21 - PARÂMETROS DE TERMOCICLAGEM UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS .....	74
TABELA 22 – LINEARIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS COM <i>Sac I</i> .....	75
TABELA 23 - MEIO DE CULTURA YPD .....	77
TABELA 24 - MEIO DE CULTURA BMGY .....	79
TABELA 25 - MEIO DE CULTURA BMMY <sub>a</sub> , b.....	79
TABELA 26 - TAMPÃO DE LISE CELULAR .....	80
TABELA 27 – CONCENTRAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1) PARA COMPOR A FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA MANANASE.....	85
TABELA 28 - DIFERENTES INTERAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1) PARA A FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE MANANASE.....	86
TABELA 29 – PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR DIFERENTES CEPAS DE <i>Aspergillus niger</i> EM FÉS E F <sub>sm</sub> .....	91
TABELA 30 - MÉDIA DE PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE MANANASE EM FESS COM CS 5% (m/v) E FS 10% (m/v).....	93
TABELA 31 - RESPOSTAS E VARIÁVEIS DECODIFICADAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3 <sup>(2-0)</sup> , PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITAÇÃO (rpm) E CONCENTRAÇÕES DE CASCAS DE SOJA (% m/v) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	98
TABELA 32 - ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DE DIFERENTES TAXAS DE AGITAÇÃO (rpm) E CONCENTRAÇÃO DE CASCAS DE SOJA (% m/v) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLENMEYER .....	99
TABELA 33 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS 5% (m/v) EM BIORREATOR DO TIPO STR (180 rpm) UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (3 E 6 L.min <sup>-1</sup> ).....	100

TABELA 34 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES SISTEMAS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS E <i>A. niger</i> NRRL 328.....	103
TABELA 35 - RESPOSTAS E VARIÁVEIS DECODIFICADAS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E DO INDUTOR (LBG) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR <i>Fsm</i> .....	105
TABELA 36 - ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E INDUTOR (LBG) PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR <i>Fsm</i> .....	107
TABELA 37 - EXEMPLOS DE ENZIMAS GLICOSILADAS EXPRESSAS EM <i>P. pastoris</i> E A RELAÇÃO COM SUA BIO-ATIVIDADE .....	128
TABELA 38 – PERCENTUAL MÉDIO DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE MANANOLÍTICA FORNECIDO PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1) .....	133
TABELA 39 – PERCENTUAL MÉDIO DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE MANANOLÍTICA FORNECIDO PELAS DIFERENTES INTERAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1).....	135
TABELA 40 - CONSTANTE (k) E MEIA-VIDA ( $t_{1/2}$ ) DO EXTRATO MANANOLÍTICO SEMI-PURIFICADO .....	138

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\alpha$  - alfa

$\beta$  – beta

ha – hectares

t - tonelada

Kg – quilograma

g – grama

mg - miligrama

mL – mililitro

L – litro

FDA – *FOOD AND DRUG ADMINISTRATION*

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

M – molar

°C – graus Celsius

™- *Trademark*

® - marca registrada

EC – Enzyme Commission

U –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto

$\text{U g}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto em 1 g de matéria seca (atividade enzimática)

$\text{U mL}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática por minuto por mL (atividade enzimática)

$\text{U mg}^{-1}$  –  $\mu\text{mol}$  de açúcar redutor gerado pela degradação enzimática em 1 minuto por mg de proteína (atividade enzimática específica)

Kat – katal

LBG- *Locust Bean Gum*

DNS – ácido 3,5-dinitrosalicílico

SDS-PAGE – Sódium-dodecil-sulfato – Poliacrylamide Gel Electrophoresis

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	24
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
3.1 MANANAS E MANANASE .....	25
3.1.1 Definição e Aplicações .....	25
3.2 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS .....	28
3.2.1 Mercado mundial de mananases .....	30
3.3 PRODUÇÃO DE MANANASES POR VIA CONVENCIONAL .....	31
3.3.1 Processos Fermentativos .....	32
3.3.1.1 Fermentação no Estado Sólido (FES) .....	32
3.3.1.2 Fermentação Submersa (FSm) .....	33
3.3.1.3 Fermentação no Estado Semissólido (FESS) .....	33
3.3.2 Biorreatores .....	35
3.3.2.1 Biorreator do tipo Tanque Agitado ( <i>Stirred Tank Reactor</i> – STR) .....	35
3.3.2.2 Biorreator do tipo Coluna de Bolhas ( <i>Bubble Column Reactor</i> – BCR) .....	36
3.4 PRODUÇÃO DE MANANASES POR VIA RECOMBINANTE .....	36
3.4.1 <i>Pichia pastoris</i> .....	38
3.4.2 Vetor de expressão integrativo .....	41
3.4.3 Cultivo celular para expressão de proteínas recombinantes .....	43
3.5 FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS ENZIMÁTICOS .....	44
3.5.1 Legislação .....	45
3.5.2 Produtos biológicos e biotecnológicos .....	47
3.5.3 Formulação de bioprodutos: Enzimas .....	48
3.5.4 Estudos de estabilidade .....	49
3.5.4.1 Fase 1: Estabilidade Acelerada .....	49
3.5.4.2 Fase 2: Estabilidade Normal .....	50
3.5.4.3 Fase 3: Teste de prateleira ou <i>Shelf-life</i> .....	50
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
4.1 MICRORGANISMO .....	52
4.2 PREPARO DO INÓCULO DE <i>Aspergillus niger</i> NRRL 328 .....	53
4.3 RESÍDUO E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS TESTADOS COMO SUBSTRATOS NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	53
4.4 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES) .....	53
4.5 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO (FESS) .....	54
4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASE .....	54
4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER .....	55
4.8 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FESS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE EM FRASCOS ERLLENMEYER .....	55

4.8.1	Influência das fontes de carbono sobre a produção de mananase em FESS...	55
4.8.2	Estudo da influência do tamanho das partículas de CS sobre a produção de mananase em FESS .....	56
4.8.3	Estudo do efeito de diferentes taxas de agitação e concentração de CS sobre a produção de mananase em FESS .....	56
4.9	PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM BIORREATORES.....	57
4.9.1	Produção de mananase por FESS em biorreator do tipo Tanque Agitado – STR.....	57
4.9.2	Produção de mananase por FESS em biorreator do tipo Coluna de Bolhas – BCR.....	58
4.10	PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm).....	59
4.10.1	FSm em frascos Erlenmeyer com extrato aquoso de CS.....	59
4.10.2	Otimização do processo de FSm em frascos Erlenmeyer para produção de mananase.....	60
4.11	CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO DA CEPA PARENTAL <i>A. niger</i> NRRL 328 PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANANASE NATIVA.....	62
4.12	EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DA CEPA PARENTAL <i>A. niger</i> NRRL 328.....	62
4.13	PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL DA CEPA PARNTAL <i>A. niger</i> NRRL-328 PARA OBTENÇÃO DO RNA MENSAGEIRO .....	64
4.14	PRIMERS E REAÇÃO EM CADEIA DA DNA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA.....	64
4.15	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE .....	65
4.16	PREPARO DO INSERTO PARA CLONAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE .....	66
4.16.1	Vetor: plasmídeo pPICZα A.....	66
4.16.2	Digestão enzimática do cDNA e plasmídeo pPICZα A com enzima de restrição <i>EcoRI</i> .....	67
4.16.3	Digestão enzimática do cDNA e plasmídeo pPICZα A com enzima de restrição <i>Xba I</i> .....	68
4.16.4	Ligação do inserto no vetor com T4 DNA ligase .....	69
4.17	CLONAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE .....	70
4.17.1	Produção de células competentes – <i>E.coli</i> DH5α.....	70
4.17.2	Transformação de <i>E. coli</i> DH5α - Choque térmico .....	71
4.17.3	Seleção dos clones recombinantes - <i>E. coli</i> DH5α.....	72
4.17.4	Propagação dos clones recombinantes ( <i>E. coli</i> DH5α) e extração dos plasmídeos recombinantes.....	72
4.18	SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES .....	73
4.19	LINEARIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM <i>Sac I</i> .....	75
4.19.1	Purificação dos plasmídeos linearizados.....	75
4.20	EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE POR <i>P. pastoris</i> GS115.....	76
4.20.1	Produção de células competentes – <i>P. pastoris</i> GS115.....	77
4.20.2	Transformação por eletroporação – <i>P. pastoris</i> GS115 .....	77
4.21	SELEÇÃO QUANTITATIVA DOS CLONES DE <i>P. pastoris</i> GS115 TRANSGÊNICOS.....	78
4.21.1	Seleção Extracelular.....	78
4.21.2	Seleção Intracelular.....	80
4.22	OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE RECOMBINANTE POR <i>P. pastoris</i> .....	80
4.22.1	Seleção de meio de cultura e estudo da cinética da expressão de mananase recombinante.....	80

4.22.2 Co-indução com sorbitol e estudo cinético .....	81
4.23 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SÓDIODODECIL SULFATO (SDS-PAGE) .....	81
4.24 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA ENZIMA MANANASE .....	84
4.24.1 Separação por membranas do extrato mananolítico .....	84
4.24.2 Estabilidade acelerada (Fase1): seleção individual dos aditivos para compor a formulação líquida de mananase .....	84
4.24.3 Estabilidade acelerada (Fase 1): estudo da interação dos aditivos selecionados .....	85
4.24.4 Estabilidade normal (Fase 2).....	86
4.24.5 Determinação da meia-vida da mananase .....	87
4.24.6 Teste de toxicidade da formulação líquida de mananase – <i>Artemia salina</i> .....	87
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>89</b>
5.1 PRODUÇÃO DE MANANASES POR DIFERENTES TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO: FES E FESS .....	89
5.1.1 Produção de mananases por FES com diferentes substratos em frascos Erlenmeyer .....	89
5.1.2 Produção de mananase por FESS com diferentes substratos em frascos Erlenmeyer .....	91
5.1.2.1 Cinética da produção de mananase por FESS em frascos Erlenmeyer.....	94
5.2 OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA PRODUÇÃO DE MANANASES POR FESS.....	95
5.2.1 Produção de mananases por FESS com diferentes fontes de carbono .....	95
5.2.2 Produção de mananases por FESS com diferentes tamanhos de partícula de CS .....	96
5.2.3 Delineamento experimental 3 <sup>(2-0)</sup> para otimização da FESS com diferentes taxas de agitação (rpm) e concentração do substrato (%CS) .....	97
5.3 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM BIORREATORES DE BANCADA..	100
5.3.1 Produção de mananases por FESS em biorreator do tipo Tanque Agitado (STR).....	100
5.3.2 Produção de mananases por FESS em biorreator do tipo Coluna de Bolhas (BCR) .....	102
5.4 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm EM FRASCOS ERLENMEYER .....	105
5.5 PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE .....	107
5.5.1 Estudo comparativo da produção de mananase pela cepa parental <i>A. niger</i> NRRL 328 com a técnica de FSm em frascos Erlenmeyer .....	108
5.5.2 Extração e purificação do RNA de <i>A. niger</i> NRRL 328.....	109
5.5.3 PCR para amplificação do cDNA .....	110
5.5.4 Digestão enzimática do vetor e do amplicon pelas enzimas de restrição <i>EcoRI</i> e <i>Xba I</i> .....	110
5.5.5 Transformação de <i>E.coli</i> DH5α por choque térmico e seleção dos clones recombinantes.....	112
5.5.6 Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes .....	114
5.5.7 Linearização com <i>Sac I</i> .....	115
5.5.8 Transformação de <i>P. pastoris</i> GS115 por eletroporação .....	116
5.6 PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE: ESTUDOS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA .....	118

5.6.1 Seleção dos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> para expressão de mananase extracelular .....	118
5.6.2 Seleção dos clones recombinantes de <i>P. pastoris</i> para expressão de mananase intracelular .....	120
5.7 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE .....	121
5.7.1 Seleção de meio de cultura e estudo cinético de expressão heteróloga de mananase.....	121
5.7.2 Co-indução com sorbitol e estudo cinético da expressão heteróloga de mananase sob diferentes temperaturas (20 e 30°C).....	123
5.7.2.1 Análise extracelular .....	123
5.7.2.2 Análise intracelular .....	125
5.8 SDS-PAGE DA MANANASE RECOMBINANTE .....	127
5.9 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA MANANASE.....	129
5.9.1 Semi-purificação do extrato mananolítico.....	129
5.9.2 Estabilidade acelerada (Fase1): Seleção individual dos aditivos para compor a formulação líquida de mananase .....	131
5.9.3 Estabilidade acelerada (Fase1): estudo de interação dos aditivos selecionados .....	134
5.9.4 Estabilidade normal (Fase 2).....	136
5.9.5 Determinação da meia-vida da mananase .....	138
5.9.6 Testes de toxicidade da formulação final líquida de mananase .....	140
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>142</b>
<b>7 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS .....</b>	<b>144</b>
<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>145</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são aplicadas industrialmente na obtenção de diversos produtos, tais como alimentos, bebidas, ração animal, tecidos, saponáceos, medicamentos, cosméticos, entre outros. Sua utilização é atribuída principalmente à redução dos custos operacionais, devido à natureza catalítica e também à biodegradabilidade destas proteínas. Em baixos níveis de dosagem, as enzimas promovem efeito igual ou superior aos obtidos por agentes químicos ou mecânicos, sem causar danos ao ambiente.

As mananases são enzimas hidrolíticas capazes de decompor as cadeias de mananas, presentes na fração lignocelulósica da parede celular vegetal. Elas vêm recebendo maior atenção nas últimas décadas, devido à sua versatilidade de aplicação. De forma similar a outras hidrolases, as mananases desempenham importante papel simplificando processos industriais e elevando a qualidade de diversos produtos, principalmente saponáceos e ração animal.

A tecnologia recombinante é atualmente, a base para a produção das enzimas industriais quase que na sua totalidade, além de ser também uma importante ferramenta para a descoberta de novas proteínas, ou otimização das já existentes.

Com variado mercado para comercialização e inexistente produção industrial no Brasil, as mananases vêm sendo pesquisadas há alguns anos pelo Programa de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UFPR. Em estudos preliminares, realizados em nível de Mestrado pela autora da presente Tese, foram selecionados a cepa fúngica *Aspergillus niger* NRRL 328 e o substrato empregado no processo de produção da enzima, desenvolvido por fermentação no estado sólido (WEINGARTNER, 2010; VANDENBERGHE *et al.*, 2012).

Apesar da técnica de fermentação sólida favorecer a utilização de fungos filamentosos, conhecidos por serem excelentes produtores de enzimas, seu escalonamento é considerado um obstáculo, pois depende de grande espaço físico e apresenta dificultada recuperação do produto final.

Com o propósito maior de viabilizar a produção de mananase no Brasil, a pesquisa aqui apresentada buscou aprofundar o conhecimento acerca da obtenção desta enzima por diferentes técnicas fermentativas, mas principalmente, pela técnica de fermentação no estado semissólido (FESS). A FESS agrega inovação à Tese

desenvolvida devido a ausência de relatos sobre sua utilização para a produção de mananases.

O incremento da atividade catalítica de mananase foi avaliado por meio da expressão heteróloga em *Pichia pastoris* como tecnologia recombinante.

Já o desenvolvimento do produto foi outro ponto abordado dentro do trabalho. Formulações enzimáticas estáveis exigem recursos e esforços que resultam da complexidade e susceptibilidade estrutural inerente às proteínas. Testes de estabilidade, com o uso de diferentes aditivos para compor a formulação líquida de mananase, foram realizados visando obter um bioproduto para aplicação em indústrias de ração animal e/ou saponáceos, a fim de suprir o mercado global em constante crescimento e futuramente obter um produto genuinamente brasileiro.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a produção de mananase por via convencional, com o emprego de diferentes técnicas fermentativas (FES, FESS e FSm) e por via recombinante (expressão heteróloga), bem como formular um produto líquido à base de mananase, com bio-atividade e estabilidade comprovadas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a produção de mananase por *Aspergillus niger* NRRL 328 pelas técnicas de FES e FESS, com o emprego de diferentes subprodutos agroindustriais como suporte e/ou substrato;
- Selecionar o melhor subproduto agroindustrial dentre bagaço de mandioca, casca de café, polpa cítrica, farelo de soja e casca de soja, para emprego como substrato sólido na produção de mananase pela técnica de FESS;
- Otimizar as condições físicas e químicas para a produção de mananase por FESS em frascos Erlenmeyer;
- Estudar preliminarmente o aumento de escala do processo de produção de mananases por FESS em biorreatores do tipo Tanque Agitado e Coluna de Bolhas;
- Produzir mananase recombinante por meio de clonagem e expressão heteróloga em *Pichia pastoris* GS115.
- Selecionar individualmente e em condição acelerada os melhores aditivos para a formulação líquida de mananase;
- Avaliar a estabilidade do formulado líquido de mananase em condição acelerada;
- Avaliar a estabilidade do formulado líquido de mananase em condições normais de armazenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MANANAS E MANANASE

##### 3.1.1. Definição e Aplicações

As  $\beta$ -mananases vem sendo classificadas dentro das famílias 5 e 26 das glicosil hidrolases (HENRISSAT; BAIROCH, 1993).

A classe de enzimas denominada endo-hidrolase engloba a endo- $\beta$ -1,4-mananase (EC 3.2.1.78), capaz de clivar ligações glicosídicas internas e transformar polissacarídeos de manana em  $\beta$ -1,4-manooligossacarídeos de cadeia curta (VAN ZYL *et al.*, 2010).

Todas as endo-1,4- $\beta$ -mananases clivam a cadeia principal de manana e geram, principalmente, manobiose e manotriose (YAMAZAKI; SINNER; DIETRICH, 1976; GÜBITZ *et al.*, 1996). Entretanto, segundo Ooi e Kikuchi (1995), poucas são as  $\beta$ -mananases que também liberam manose à partir de mananas.

Para que ocorra a completa hidrólise da estrutura da manana, a ação sinérgica de endo e exohidrolases (como, por exemplo, a  $\beta$ -manosidase EC 3.2.1.25) se faz necessária, juntamente com enzimas que clivam as cadeias laterais (MOREIRA; FILHO, 2008). Heterosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre a cadeia principal e as cadeias laterais) e homosinergias (a ação sinérgica das enzimas entre as duas cadeias principais ou, entre as duas cadeias laterais) são relatadas na completa degradação dos polissacarídeos de mananas (SHALLOM; SHOHAM, 2003; VAN ZYL *et al.*, 2010).

A manana é encontrada na natureza como componente estrutural lignocelulósico de células vegetais, o qual consiste em hemicelulose, celulose e lignina, com uma representação aproximada de 1:2:1 (FIGURA 1). A biomassa lignocelulósica vegetal constitui a principal fonte renovável de carbono na natureza. Além da aplicação na alimentação humana e animal, é também utilizada como matéria-prima ou fonte de energia para indústrias de química orgânica (VAN ZYL *et al.*, 2010).

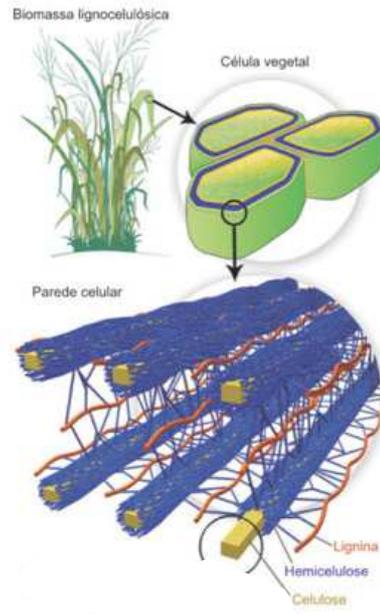


FIGURA 1 - ESTRUTURA LIGNOCELULÓSICA DE FIBRA VEGETAL  
 FONTE: Adaptado de Image Gallery Gateway (2012)

A porção hemicelulósica intercalada com celulose e lignina completa a matriz que torna a parede celular vegetal recalcitrante à degradação microbiana, porém com flexibilidade suficiente para que ocorram movimento e crescimento celular (CHANG, 2007; GRAY; ZHAO, 2006; VAN ZYL *et al.*, 2010).

De acordo com Bisaria e Ghose (1981), os heteropolissacarídeos lineares ou ramificados, tal como as hemiceluloses, são classificados de acordo com o açúcar predominante na sua cadeia principal: xilanas (D-xilose), galactanas (D-galactose), arabinanas (L-arabinose) e mananas (D-manose).

As mananas são o principal polissacarídeo hemicelulósico encontrado em coníferas e estruturas especializadas de plantas (sementes e frutos). Dividem-se em dois grupos principais (ambos unidos por ligações  $\beta$ -1,4), podendo conter somente resíduos de D-manose (mananas propriamente ditas) ou uma combinação de resíduos de D-manose e D-glicose (glucomananas) (GIRIO *et al.*, 2010).

Cadeias lineares de mananas e glucomananas, contendo mais de 5% (p/p) de D-galactose e unidas por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6, são denominadas galactomananas e galactoglucomananas, respectivamente (MOREIRA; FILHO, 2008).

Na FIGURA 2, estão ilustradas as enzimas requeridas para a completa hidrólise das diferentes estruturas de mananas.

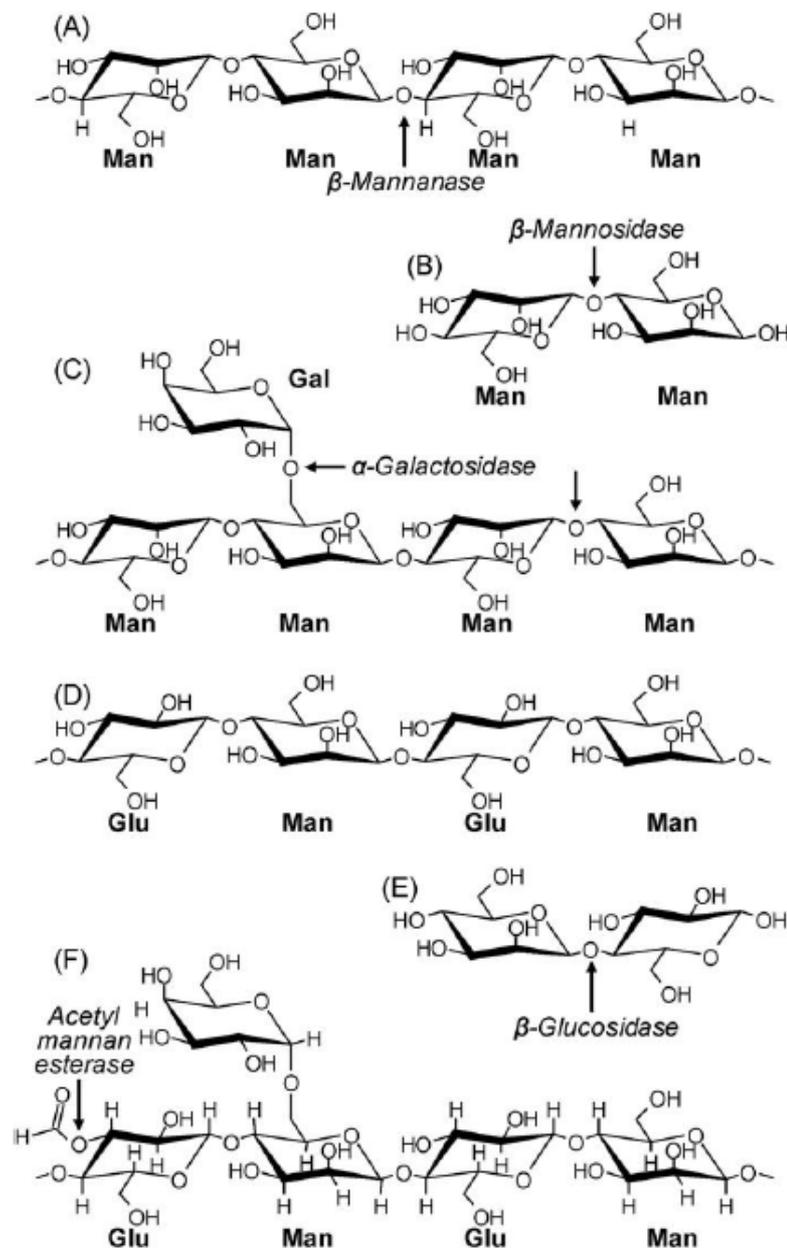


FIGURA 2 - ESTRUTURAS ILUSTRATIVAS DE DIFERENTES FORMAS DE MANANAS E AS ENZIMAS REQUERIDAS PARA SUA HIDRÓLISE. MANANA LINEAR (A), GALACTOMANANA RAMIFICADA(C), GLUCOMANANA LINEAR (D), E GALACTOGLUCOMANANA RAMIFICADA (F). A ESTRUTURA DA MANANA É HIDROLIZADA POR  $\beta$ -MANANASE, AO PASSO QUE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE E ACETIL MANANA ESTERASE LIBERAM GALACTOSE E GRUPOS ACETIL RESPECTIVAMENTE. OS PRODUTOS GERADOS PELA AÇÃO DA  $\beta$ -MANANASE, MANOSE (B) E GLICOMANOSE (E), SÃO EM SEGUIDA HIDROLIZADOS POR  $\beta$ -MANOSIDASE E  $\beta$ -GLICOSIDASE PARA FINALMENTE GERAREM MONOSSACARÍDEOS DE MANOSE, GLICOSE E GALACTOSE. FONTE: van Zyl *et al.* (2010)

As aplicações para as mananases são as mais diversas. Na TABELA 1, estão listadas as várias utilizações desta enzima na indústria.

TABELA 1 - EXEMPLOS DE APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DA MANANASE

SETOR INDUSTRIAL	FINALIDADE	APLICAÇÃO	REFERÊNCIA
Alimentício	Obtenção de manooligossacarídeos	Aditivo alimentar sem valor nutricional utilizado para o incremento de microflora intestinal benéfica em humanos; Adoçante alimentar	Tomotari (1990) Puchart <i>et al.</i> (2004)
	Redução de viscosidade	Extração e liquefação de frutas para obtenção de sucos	Christgau <i>et al.</i> (1994) Puchart <i>et al.</i> (2004)
		Processamento de café para melhor volatilidade do aroma, sabor e aparência da bebida final	Nicolas <i>et al.</i> (1998) Nunes e Coimbra (1998)
Papel e celulose	Conversão de biomassa residual em açúcares	Incremento de matéria-prima para ração animal	Chandrakant e Bisaria (1998) Lin e Chen (2004)
	Redução de agentes químicos na etapa de branqueamento	Extração lignocelulósica	Buchert <i>et al.</i> (1993) Suurnäkki <i>et al.</i> (1996) Gübitz <i>et al.</i> (1996)
Saponáceos	Formulação de detergentes	Auxílio na remoção de manchas	Cavaco-Paulo (1998) Jørgensen <i>et al.</i> (2003)
Combustível	Produção de bioetanol	Hidrólise de material lignocelulósico	Sheehan e Himmel (1999) Jørgensen <i>et al.</i> (2003)

### 3.2 MERCADO MUNDIAL DE ENZIMAS

São conhecidas aproximadamente 4000 enzimas, entretanto, apenas cerca de 200 provenientes de fonte microbiana são comercializadas e 20 são produzidas efetivamente em larga escala. Nesse contexto, 75% pertencem à classe das hidrolases (a qual engloba hemicelulases, tal como a mananase), com atuação predominante de carboidrases, proteases e lipases, que dominam o mercado e totalizam cerca de 70% das vendas (LI *et al.*, 2012).

De acordo com Van Beilen e Li (2002) e Coelho, Salgado e Ribeiro (2008), as hidrolases são aplicadas industrialmente conforme o gráfico (FIGURA 3):

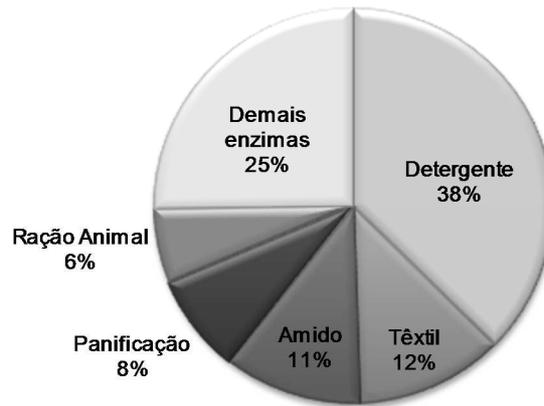


FIGURA 3 – APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DAS HIDROLASES  
 FONTE: Adaptado de Coelho, Salgado e Ribeiro (2008)

O mercado mundial de enzimas teve seu pico de crescimento na década de 1970, devido principalmente à aplicação na indústria alimentícia. O emprego das mesmas abrangeu desde a matéria-prima até o sistema operacional, reduzindo custos da ordem de 9 a 90%, o que tornou o processo produtivo mais sustentável (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008).

Em 2010 a demanda global por enzimas teve uma previsão de crescimento acima de 7% ao ano, o que gerou uma estimativa de aproximadamente 8 bilhões de dólares para o ano vigente de 2015. Tal incremento é devido principalmente à elevação no custo de energia e também à facilitada legislação instituída nos Estados Unidos, para o rápido crescimento do mercado de combustível à base de etanol. Adicionalmente, a expansão no crescimento da classe média nos países em desenvolvimento, tal como o Brasil, contribuiu especialmente para o incremento nos ganhos das indústrias de alimentos e bebidas e também farmacêutica (LI *et al.*, 2012).

A demanda global de enzimas é satisfeita quase que na sua totalidade por 4 gigantes do cenário mundial:

- Novozymes, com sede na Dinamarca e várias plantas espalhadas pelo mundo, dentre as quais duas localizadas no Brasil, mais especificamente na região metropolitana de Curitiba;
- DuPont, americana, subsidiária da Danisco e de sua importante divisão, a Genencor);

- A holandesa DSM dedicada principalmente à indústria de alimentos e ração animal;
- E a suíça Roche, com foco na indústria farmacêutica para o tratamento de doenças.

O restante do mercado de enzimas se divide entre um número pequeno de produtores do Canadá, Estados Unidos, Japão, China e Europa.

### 3.2.1 Mercado mundial de mananases

No âmbito das mananases, duas aplicações comerciais se destacam: a indústria de detergentes e ração animal.

Dentre as grandes indústrias de enzimas, a Novozymes produz o Mannaway™. Destinada à indústria de detergentes, a mananase Mannaway™ integra desde o ano 2000, marcas famosas como Tide (Procter & Gamble) e Omo (Unilever) (Schäfer *et al.*, 2015).

Já a DuPont restringe a divulgação de informações específicas sobre os seus produtos mas, há relatos de que a gigante americana é detentora de mananases para detergentes tal como Mannastar® 375 (ENZYME SOLUTIONS, 2015) e Purabrite™ Mannanase (DUPONT, 2003).

Destinada à suplementação de ração animal, diversos outros produtos à base de mananase estão disponíveis no mercado: Beta-mannanase 1.0 (AMERICAN BIOSYSTEMS INC., 2015),  $\beta$ -Mannanase (HABIO ENZYME, 2015), Creazyme™ (CRVAB, 2015), porém, o mais conhecido para esta aplicação, Hemicell®, é produzido pela Elanco (divisão da americana Eli Lilly and Company) e indicado para rações compostas por farelo de soja (ELANCO, 2015).

Originários de países asiáticos, diversos produtos que anunciam ser/conter mananase, são oferecidos no comércio eletrônico atacadista, tal como a plataforma Alibaba.com.

### 3.3 PRODUÇÃO DE MANANASES POR VIA CONVENCIONAL

Apesar das enzimas serem obtidas de três grandes fontes: vegetal, animal e microbiana é desta última que provém a maior parte utilizada nos mais diversos segmentos industriais (KIRK; BORCHERT; FUGLSANG, 2002).

Na produção de enzimas por via convencional, o processo fermentativo é o ponto de referência, onde poucas são as etapas que o antecedem (geralmente, apenas o preparo do inóculo e meio de cultivo)

Lin e Chen (2004) afirmam que, apesar de vários microrganismos serem capazes de decompor mananas, *Trichoderma reesei*, *Sclerotium rolfsii* e *Aspergillus niger* são os que detêm a maior atenção da comunidade científica.

Vries e Visser (2001) relatam que o fungo filamentososo *A.niger* (FIGURA 4) é conhecido por secretar várias enzimas hidrolíticas, capazes de degradar biomassa vegetal em açúcares.

O ascomiceto é considerado um microrganismo de uso seguro para aplicações agroalimentares e figura entre os mais importantes para a biotecnologia industrial (SCHUSTER *et al.*, 2002; TSANG *et al.*, 2009).

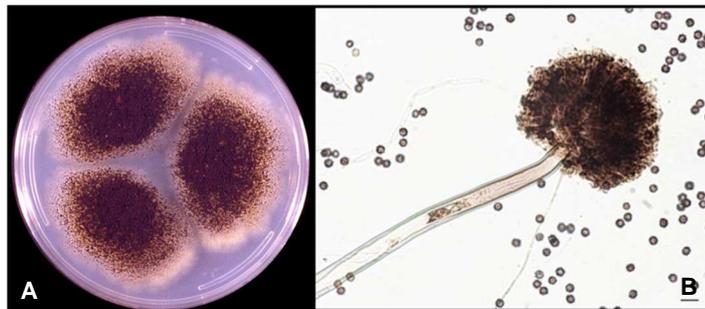


FIGURA 4 – A) *Aspergillus niger* EM PLACA DE PETRI CULTIVADO EM MEIO DE CULTURA CZAPECK DOX

B) *Aspergillus niger* VISUALIZADO SOB MICROSCÓPIO ÓPTICO  
 FONTE: A) University of Adelaide (2014); B) St-Pierre (2014)

As operações posteriores ao processo fermentativo dependem basicamente se a enzima está presente no conteúdo intracelular, ou se é secretada pelo microrganismo no caldo fermentado (extracelular).

Em poucas situações o caldo fermentado é separado das células microbianas e diretamente comercializado, sem processamento adicional, porém, na

maioria das vezes, a enzima de interesse é recuperada do caldo fermentado passando por diversas etapas de purificação até se obter o produto desejado (SANT'ANNA JR., 2001).

As propriedades intrínsecas das enzimas extracelulares microbianas, tais como faixa ótima de temperatura e pH para atividade, estabilidade, e afinidade pelo substrato, podem ser influenciadas pelo tipo de processo fermentativo adotado na sua obtenção (ALAZARD; RAIMBAULT, 1981; GRAMINHA *et al.*, 2008).

### 3.3.1 Processos Fermentativos

#### 3.3.1.1 Fermentação no Estado Sólido (FES)

A FES é muito antiga e, apesar da dificuldade em precisar o início desta prática pela atividade humana, sabe-se que a dieta de vários povos em países orientais, asiáticos e africanos, há séculos se dá por alimentos que utilizam esse processo (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Definida como um processo fermentativo que ocorre na ausência ou quase ausência de água livre, e no qual se emprega um substrato natural ou inerte como suporte sólido, a FES envolve tipicamente o crescimento de fungos filamentosos que encontram neste sistema, condições muito similares ao seu habitat natural (PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008).

Do ponto de vista da ciência, pesquisadores do mundo todo vêm estudando a FES devido especialmente às peculiaridades que envolvem o processo.

A possibilidade de se empregar resíduos e subprodutos agroindustriais tornam a FES interessante do ponto de vista econômico, especialmente em países com abundante biomassa vegetal, como por exemplo, o Brasil (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

Entretanto, devido ao grande sucesso da fermentação submersa (FSm), mesmo detentora de considerável potencial econômico para a indústria de produtos farmacêuticos, alimentícios e de agroprodutos, a FES é pouco explorada no âmbito industrial em países ocidentais (SOCCOL; VANDENBERGHE, 2003).

### 3.3.1.2 Fermentação Submersa (FSm)

Na FSm, o meio líquido que contém nutrientes dissolvidos fica contido em tanques cilíndricos, os quais variam na sua matéria prima e tamanho.

A FSm oferece diversas vantagens sob a FES, as quais se destacam a facilidade no controle dos parâmetros operacionais e a necessidade de pouco espaço físico (KUMAR; LONSANE, 1989).

El-Helow *et al.* (1997) e Feng *et al.* (2003) relatam que a produção de enzimas é realizada por ambos os processos fermentativos: sólido e submerso. Entretanto, poucos são os estudos que utilizam a fermentação no estado semissólido relatados para este fim.

### 3.3.1.3 Fermentação no Estado Semissólido (FESS)

Também conhecida como Fermentação Submersa com Substrato em Suspensão, a FESS é uma mistura das duas principais técnicas fermentativas, FES e FSm. Assemelha-se à FES quanto ao emprego de substratos sólidos indissolúveis, porém, se diferencia devido à presença de grande quantidade de líquido livre.

Tal característica aproxima a FESS à FSm, proporcionando melhor e mais fácil recuperação do produto - a grande trave do processo fermentativo sólido (RODRIGUEZ COUTO; DOMINGUEZ; SANROMAN, 2001; MAJEAU; BRAR; TYAGI, 2010).

São desconhecidos os relatos na literatura para a produção de mananase com o emprego da técnica de FESS.

Na TABELA 2 estão listadas algumas pesquisas realizadas para obtenção de mananase pela técnica de FES e FSm. No entanto, é importante notar que variações nas condições do ensaio enzimático podem ser observadas para uma mesma enzima. Assim, é sempre difícil comparar resultados de atividade enzimática obtidos por diversos autores, em função da falta de definição de padrões consensualmente aceitos.

TABELA 2 - PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA CONVENCIONAL UTILIZANDO AS TÉCNICAS DE FSm E FES

MICROORGANISMO	PROCESSO FERMENTATIVO	MEIO E BIORREATOR	PRODUÇÃO DE MANANASE	REFERÊNCIA
<i>Aspergillus niger</i>		Meio sintético em frascos agitados	56 nkat mL <sup>-1</sup>	Ademark <i>et al.</i> (1998)
<i>Aspergillus niger</i>		Copra desengordurada e meio sintético em frascos agitados	28 U mL <sup>-1</sup>	Lin e Chen (2004)
<i>Bacillus subtilis</i>	FSm	Meio sintético em frascos agitados	1105 U mL <sup>-1</sup>	Jiang <i>et al.</i> (2006)
<i>A. niger</i> , <i>A. flavus</i> e <i>A. ochraceous</i>		Meio sintético em frascos estáticos	2,90; 2,54 e 2,16 U mL <sup>-1</sup>	Alsarrani (2011)
<i>Aspergillus niger</i>		Meio sintético em frascos agitados	1495 nkat mL <sup>-1</sup>	Mohamad <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus circulans</i>		Resíduo fibroso de soja e solução nutritiva em biorreator cilíndrico	0,540 U mg <sup>-1</sup>	Heck, Soares e Ayub (2005)
<i>Pleurotus ostreatus</i>		Palha de trigo e meio sintético em colunas de vidro	114,7 mU g <sup>-1</sup>	Baldrian <i>et al.</i> (2005)
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>		<i>Chips</i> de <i>Pinus taeda</i> em biorreator de leito estático	0,25 U g <sup>-1</sup>	Magalhães e Milagres (2009)
<i>Aspergillus niger</i>		Farelo de soja e solução mineral em frascos	11,3 U mL <sup>-1</sup>	Cha <i>et al.</i> (2010)
<i>Aspergillus niger</i> mutado por irradiação	FES	Farelo de trigo e solução nutritiva em frascos	36675 U g <sup>-1</sup>	Wu <i>et al.</i> (2011)
<i>Bacillus sp.</i>		Resíduo de coco desengordurado e solução nutritiva em frascos	870 U g <sup>-1</sup>	Srivastava e Kapoor (2013)
<i>Aspergillus terreus</i>		Torta de semente de palma e solução nutritiva em frascos	417 U g <sup>-1</sup>	Soni <i>et al.</i> (2015)
<i>Penicillium chrysogenum</i>		Farelo de trigo, pó de palha de milho e solução nutritiva em frascos	8479 U g <sup>-1</sup>	Zhang e Sang (2015)

katal (kat) é definido como a quantidade de enzima que transforma um mol de substrato por segundo, sob condições experimentais padrões (ADEMARK *et al.*, 1998)

Unidade Internacional (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto (manose) por minuto em condições experimentais estabelecidas (RODRIGUES; SOCCOL, 2009)

### 3.3.2 Biorreatores

No período da Segunda Guerra Mundial (1939 – 1945), com a produção de penicilina, ocorreu o desenvolvimento de processos envolvendo FSm em tanques profundos. Desde então, as pesquisas se voltaram ao desenvolvimento de projetos de fermentadores que utilizam sistemas de fase líquida (MITCHEL; VON MEIEN; KRIEGER, 2003).

Os biorreatores, também conhecidos como reatores bioquímicos ou reatores biológicos, são reatores onde as reações químicas ocorrem por intermédio de biocatalisadores, os quais podem ser enzimas ou células vivas (animais, vegetais e microbianas) (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

Os frascos Erlenmeyers são reatores utilizados em escala laboratorial, muitas vezes para o início de estudos e otimização dos processos desenvolvidos em escala laboratorial. São feitos de vidro e geralmente fechados com tampões de algodão. Neste caso, a aeração se dá por difusão e o processo pode ocorrer em modo estático ou sob agitação. Entre as vantagens, destacam-se o baixo custo, facilidade de manuseio e a possibilidade de se realizar vários testes simultaneamente (SERMANI; TISO, 2008; DURAND, 2002).

Entretanto, para o avanço dos estudos relacionados ao processo produtivo, o uso de biorreatores se faz necessário na etapa semipiloto e piloto, para melhor compreensão dos parâmetros envolvidos.

Dentre as várias configurações de biorreatores existem dois tipos que operam em sistemas submersos e se baseiam em tanques cilíndricos, a configuração mais utilizada em bioprocessos e a qual também pode ser aplicada para a produção de enzimas com as técnicas de FSm e FESS (DORAN, 1995).

#### 3.3.2.1 Biorreator do tipo Tanque Agitado (*Stirred Tank Reactor* – STR)

De acordo com Doran (1995), os biorreatores do tipo STR consistem de tanques cilíndricos fabricados de diferentes materiais. São agitados mecanicamente por meio de pás internas denominadas impelidores e a aeração é feita por um sistema de compressão do ar, distribuído através de difusores localizados na parte inferior do tanque cilíndrico.

A troca de calor pode ocorrer através de serpentina interna, ou de uma camisa externa de resfriamento, e o controle de parâmetros como pH e injeção de anti-espumante podem ser efetuados automaticamente, dependendo do modelo do equipamento.

### 3.3.2.2 Biorreator do tipo Coluna de Bolhas (*Bubble Column Reactor* - BCR)

Os biorreatores do tipo BCR consistem igualmente de um tanque cilíndrico, porém não possuem impelidores. Neste caso, a agitação ocorre de forma pneumática, ou seja, pela movimentação de bolhas de ar que são injetadas no biorreator. O ar é alimentado através de um compressor sendo injetado por um difusor, o qual é a única estrutura interna presente no tanque cilíndrico.

Existem diferentes modelos de difusores, os quais propiciam a formação de diferentes tamanhos de bolhas e diferentes fluxos de ar, a depender da pressão imposta. Quanto menor for o tamanho de bolhas, melhor será a transferência de massa e de oxigênio.

Outra vantagem dos biorreatores do tipo BCR, é a possibilidade de sua aplicação em processos que empregam células mais sensíveis às tensões de cisalhamento, criadas principalmente pela agitação mecânica (DORAN, 1995; KANTARCIA; BORAK; ULGEN, 2005).

## 3.4 PRODUÇÃO DE MANANASES POR VIA RECOMBINANTE

Os fungos filamentosos são utilizados há mais de 50 anos na produção de enzimas industriais. No entanto, a maioria deles produz diversas enzimas simultaneamente (FIGURA 5), resultando em produtos com diferentes proteínas que “contaminam” a enzima de interesse (DALBØGE, 1997). O mesmo autor afirmou há mais de 15 anos, que 50% das enzimas industriais já eram produzidas de modo recombinante e que o crescimento deste percentual já era algo esperado naquela época.

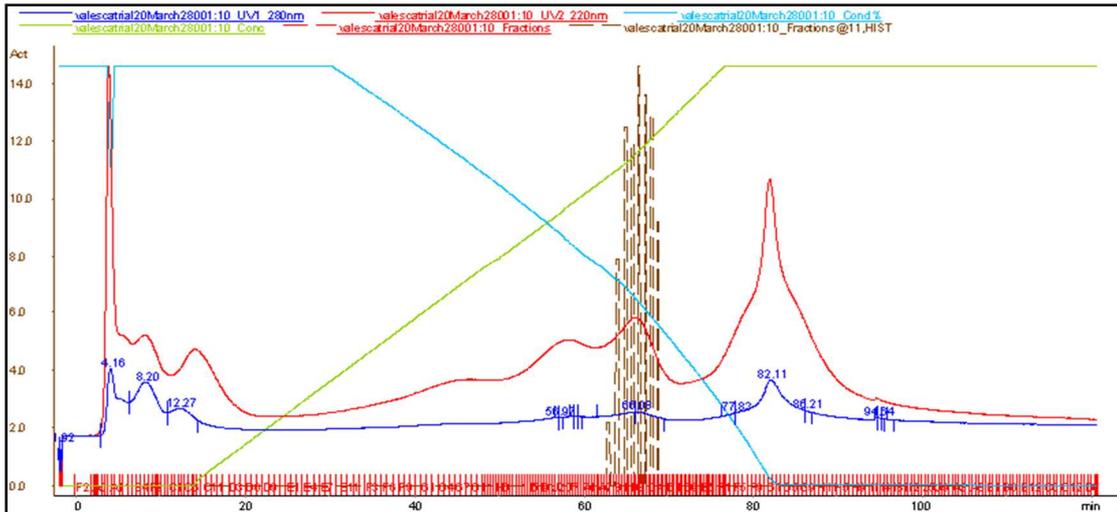


FIGURA 5 - EXTRATO ENZIMÁTICO PROVENIENTE DE FERMENTAÇÃO SÓLIDA COM *A. niger* NRRL 328, ANALIZADO POR CROMATOGRAFIA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA  
 FONTE: A autora (2013)

Como exemplo desta mistura de enzimas, pode-se citar as celulasas, as quais interferem na ação das mananases quando aplicadas no branqueamento em indústrias de papel e celulose. Ambas são produzidas por *Aspergillus aculeatus*, porém a celulase é capaz de degradar o produto de interesse final (SUURINAKI *et al.*, 1997; SETATI *et al.*, 2001).

A engenharia genética além de propiciar o incremento da atividade catalítica de enzimas recombinantes, também possibilita sua expressão individual em linhagens hospedeiras que não as produziram naturalmente. Esta ferramenta minimiza a necessidade de dispendiosas etapas de purificação (SETATI *et al.*, 2001).

Submissões da seqüência genômica de linhagens de *A. niger* como, por exemplo, a CBS 153.88 tornaram possível conduzir pesquisas sobre a produção de enzimas via recombinante, a partir de um dos microrganismos mais explorados pela via convencional (PEL *et al.*, 2007).

Não existe um sistema de expressão único, capaz de prover todas as propriedades desejadas à produção de proteínas recombinantes. Segundo Çelik e Çalik (2012), o sistema considerado ideal requer planejamento e envolve várias etapas consideradas cruciais. Estas etapas são:

- Seleção da linhagem hospedeira que possibilita o correto dobramento da proteína e modificações pós-traducionais;

- Escolha do vetor (episomal ou integrativo) com o promotor mais adequado (constitutivo, induzível ou repressível), bem como, marcador selecionável;
- Opção por um gene que seja capaz de se fundir a um epítipo marcador, em caso de necessidade (para purificação por afinidade ou detecção da proteína recombinante, por exemplo);
- Escolha da sequência sinalizadora capaz de direcionar a proteína recombinante de modo intra ou extracelular;
- Determinação de medidas preventivas à clivagem proteolítica da proteína de interesse;
- Otimização da composição do meio fermentativo (fontes de carbono, nitrogênio e condições para indução da proteína recombinante);
- Otimização das variáveis do processo fermentativo (temperatura, pH e transferência de oxigênio).

*Saccharomyces cerevisiae* foi o primeiro e melhor caracterizado sistema de expressão desenvolvido a partir de leveduras na década de 80. Quase 40 anos depois, é ainda altamente explorado e conhecido por seu tradicional uso na fabricação de pães, bebidas e vinhos (ÇELIK; ÇALIK, 2012). Entretanto, o número de produtos comercializados obtidos a partir de *S. cerevisiae* é limitado devido aos numerosos casos de instabilidade plasmidial, baixo rendimento protéico e hiperglicosilação das proteínas (BUCKHOLZ; GLEESON, 1991; GELLISSEN *et al.*, 2005; ÇELIK; ÇALIK, 2012).

#### 3.4.1 *Pichia pastoris*

De acordo com Çelik e Çalik (2012), as leveduras têm se popularizado como organismos hospedeiros para a produção de proteínas recombinantes devido à combinação das vantagens oferecidas pelos organismos unicelulares, tais como, a facilitada manipulação genética e o rápido crescimento celular, aliados à habilidade de realizar modificações pós-traducionais dos eucariotos. Além disso, ao contrário dos eucariotos mais complexos, as leveduras são um sistema de expressão

econômico e ainda produzem elevado teor de proteínas, sem pirógenos, patógenos ou inclusões virais (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Ao estudar a expressão de enzimas por diferentes leveduras (*S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*), Dalbøge (1997) afirmou que é possível encontrar células hospedeiras melhores que *S. cerevisiae* para a produção de enzimas.

A metilotrófica *Pichia pastoris* (FIGURA 6) é preferida por muitos pesquisadores quando comparada à *S. cerevisiae* (ROMANOS; SCORER; CLARE, 1992; HADFIELD *et al.*, 1993; SETATI *et al.*, 2001).

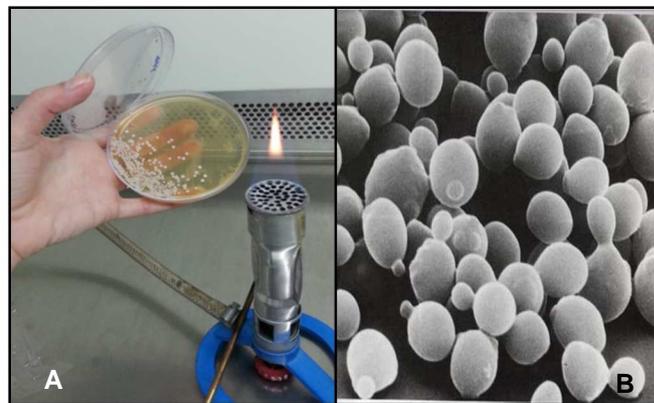


FIGURA 6 – A) *Pichia pastoris* EM PLACA DE PETRI CULTIVADA EM MEIO DE CULTURA YPD  
 B) *Pichia pastoris* VISUALIZADA SOB MICROSCOPIA  
 FONTE: A) A autora (2014); B) Meddic (2014)

Todas as linhagens de *P. pastoris* utilizadas como hospedeiras para a expressão de proteínas recombinantes, são derivadas da linhagem selvagem NRRL-Y 11430 (*Northern Regional Research Laboratories*). A maioria delas possui uma mutação no gene *HIS4* (histidinol-desidrogenase), que permite a seleção de vetores de expressão que contenham o gene *HIS4*, após ocorrer a transformação (CREGG *et al.*, 1985; LI *et al.*, 2007).

Conforme Çelik e Çalik (2012), o sistema de expressão *P. pastoris* foi patenteado pelo *Research Corporation Technologies* (Tucson, Arizona, EUA) e os kits de expressão disponíveis para utilização em pesquisa, são comercializados pela *Invitrogen Corporation* (Carlsbad, Califórnia EUA).

O primeiro polipeptídeo de uso terapêutico, expresso por *P. pastoris*, recebeu aprovação da *Food and Drugs Administration* (FDA) em 2009, e vem sendo

produzido pela *Dyax Corporation* (Cambridge, MA), para tratamento de angioedema hereditário (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Segundo Li *et al.* (2007), a produção de proteínas recombinantes por linhagens de *P. pastoris* possui muitas vantagens em relação a outros sistemas de expressão eucarióticos e procarióticos, tais como:

- Rápida taxa de crescimento celular associada à facilidade da fermentação de células com elevada densidade;
- Elevado nível de produtividade em meios de cultura com baixo teor de proteínas;
- Eliminação de contaminação por bacteriófagos e endotoxinas;
- Fácil manipulação genética devido aos bem caracterizados vetores de expressão para leveduras;
- Ausência de patogenicidade humana conhecida, dentro do espectro de vírus líticos que atacam *P. pastoris*;
- Diversidade de modificações pós-traducionais que incluem o dobramento de polipeptídeos, glicosilação, metilação, acilação, ajuste proteolítico e marcação para compartimentos subcelulares;
- Habilidade para engenheirar as proteínas secretadas, as quais podem ser purificadas a partir do meio de crescimento, sem precisar recuperar as células.

Três linhagens hospedeiras distintas de *P. pastoris* estão disponíveis e variam entre si conforme a sua habilidade em processar metanol. A maioria delas, incluindo a linhagem GS115 (*his4*), a hospedeira mais comumente utilizada para expressão, são classificadas quanto ao seu fenótipo como Mut<sup>+</sup>, pois crescem em taxa de metanol tal como a linhagem selvagem, uma vez que possuem os genes *AOX1* e *AOX2* intactos. Os outros dois fenótipos existentes são Mut<sup>s</sup> (processa metanol de forma lenta uma vez que possui o gene *AOX1* interrompido e o gene *AOX2* intacto) e Mut<sup>-</sup> (não processa metanol, pois possui ambos os genes *AOX 1* e *2* deletados) (LI *et al.*, 2007, ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Ao serem capazes de induzir a expressão com uma pequena quantidade de metanol, os diferentes fenótipos de *P. pastoris* oferecem mais uma vantagem aos processos em larga escala, uma vez que grandes quantidades de metanol são

consideradas tóxicas e oferecem risco de incêndio (VEENHUIS; VAN DIJKEN; HARDER, 1983; TSCHOPP *et al.*, 1987; LI *et al.*, 2007).

De modo geral, a expressão de um gene externo em *P. pastoris* requer três passos principais: a inserção do gene de interesse em um vetor de expressão; a integração deste vetor de expressão no genoma da *P. pastoris*; e a seleção das estirpes com potencial para expressar o gene de interesse (LIN-CEREGHINO *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2007).

#### 3.4.2 Vetor de expressão integrativo

Um típico vetor de expressão é composto por uma unidade eucariótica de transcrição com uma sequência promotora, um sítio de clonagem simples ou múltipla e uma sequência de terminação da transcrição.

Devido ao não desenvolvimento de vetores episomais para *P. pastoris*, os vetores de expressão são usualmente do tipo integrativo.

Estes vetores geram clones de expressão mais estáveis (ainda que na presença de múltiplas cópias do gene de interesse), uma vez que não requerem pressão seletiva durante o processo de produção das proteínas recombinantes (LI *et al.*, 2007; ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Os plasmídeos integrativos são incorporados ao genoma da levedura por recombinação homóloga (FIGURA 7), portanto, estes plasmídeos também possuem DNA homólogo para o locus alvo (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

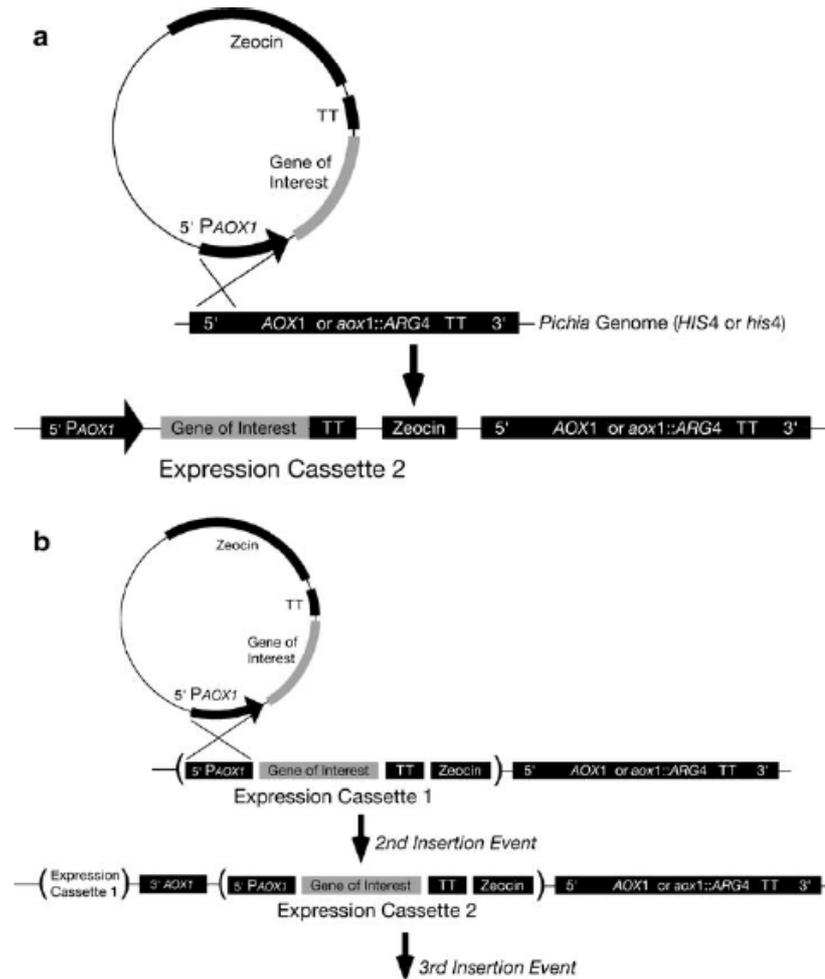


FIGURA 7 - MAPA DA INTEGRAÇÃO DE GENE HETERÓLOGO NO GENOMA DE *P.pastoris*. (a) INTEGRAÇÃO DE CÓPIA SIMPLES; (b) INTEGRAÇÃO DE CÓPIAS MÚLTIPLAS  
 FONTE: Adaptado de Li *et al.* (2007)

Para a secreção extracelular de proteínas recombinantes, alguns vetores de expressão comercializados possuem uma sequência que codifica o sinal de secreção, localizado na estrutura do sítio de clonagem múltipla.

Além disso, as sequências que codificam para purificação por afinidade ou detecção da proteína recombinante localizadas no marcador epítipo, por exemplo, marcadores 6xHis, FLAG, HA e c-Myc, são geralmente incluídos na estrutura com o gene de interesse (BRIZZARD; CHUBET; VIZARD, 1994; CRAVCHIK; MATUS, 1993; MARTZEN *et al.*, 1999; ÇELIK; ÇALIK, 2012).

Segundo Çelik e Çalik (2012), a escolha do promotor para a expressão do gene heterólogo afeta muito o rendimento do produto desejado. Vários promotores estão disponíveis, podendo ser heterólogos e homólogos, bem como constitutivos e

induzíveis. Na TABELA 3 estão listados os promotores utilizados para a produção de proteínas recombinantes em *P. pastoris*.

TABELA 3 - PROMOTORES UTILIZADOS PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *P. pastoris*

PROMOTOR	TIPO DE REGULAÇÃO	REFERÊNCIA
AOX1	Induzível (metanol)	Tschopp <i>et al.</i> (1987)
FLD1	Induzível (metanol, metilamina)	Shen <i>et al.</i> (1998)
GAP	Constitutiva	Waterham <i>et al.</i> (1997)
PEX8	Induzível (metanol, oleato)	Johnson <i>et al.</i> (1999)
YPT1	Constitutiva	Sears <i>et al.</i> (1998)

FONTE: Adaptado de Çelik e Çalik (2012)

### 3.4.3 Cultivo celular para expressão de proteínas recombinantes

Para a produção de proteínas recombinantes em processos fermentativos com alta densidade de células, o meio mais comumente utilizado é composto por um meio basal, solução de elementos traços (PTM1), hidróxido de amônio como fonte de nitrogênio e várias combinações de glicerol/metanol como fonte de carbono e energia (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

As variáveis de operação de um processo de cultivo celular que incluem a composição do meio de cultura, temperatura, pH, agitação e aeração, indução e estratégias de alimentação, podem influenciar muito o rendimento e a qualidade do produto (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

O pH do meio fermentativo exerce um importante papel no processo, pois a taxa de crescimento celular, a atividade enzimática e a ação de enzimas proteolíticas, são dependentes deste parâmetro. De acordo com Inan *et al.* (1999), valores de pH que variam de 3,5 a 5,5 quase não afetam a taxa de crescimento de fenótipos Mut<sup>+</sup> de *P. pastoris*.

Quanto à temperatura, a maior parte dos processos que utilizam *P. pastoris*, ocorre a 30 °C, considerada a temperatura ótima para o seu crescimento. Dragosits *et al.* (2009), relatam que a diminuição da temperatura para 20 °C, aumentou 3 vezes a produtividade de proteínas recombinantes obtida em culturas quimiostáticas de *P. pastoris*.

O oxigênio, utilizado na oxidação do metanol em formaldeído como uma reação paralela, requer elevadas taxas de transferência, a qual conduz à formação

do produto. Para fornecer a quantidade de oxigênio necessária, a resistência de transferência é minimizada por elevada agitação e o ar enriquecido de oxigênio é então utilizado (SIBIRNY *et al.*, 1990).

Abaixo, uma lista de recentes publicações sobre a produção de mananases recombinantes, com os microrganismos parentais e hospedeiros utilizados para a expressão heteróloga da enzima (TABELA 4). Nota-se que os índices de atividade de mananase recombinante são os mais diversos possíveis e partem de apenas 20 U mL<sup>-1</sup>. Além disso, dentre os trabalhos listados, mais de 60% foram realizados com a levedura *P. pastoris* como hospedeiro para a expressão heteróloga da enzima e, apesar de várias mananases serem originalmente nativas de linhagens do gênero *Aspergillus* sp., nenhuma foi proveniente da cepa utilizada neste trabalho, *A. niger* NRRL 328.

TABELA 4 - PESQUISAS RECENTES SOBRE A PRODUÇÃO DE MANANASE RECOMBINANTE

MICROORGANISMOS (PARENTAL E HOSPEDEIRO)	ATIVIDADE DE MANANASE	REFERÊNCIA
<i>Bacillus</i> sp. N16-5 e <i>P. pastoris</i>	32,2 U mL <sup>-1</sup>	He <i>et al.</i> (2008)
<i>Cryptopygus antarcticus</i> e <i>Escherichia coli</i>	416,3 U mg <sup>-1</sup>	Song <i>et al.</i> (2008)
<i>A. niger</i> BK01 e <i>P. pastoris</i>	669 U mL <sup>-1</sup>	Bien-Cuong <i>et al.</i> (2009)
<i>A. aculeatus</i> MRC11624 e <i>Yarrowia lipolytica</i>	26139 nkat/mL	Roth, Moodley e van Zyl (2009)
<i>A. aculeatus</i> VN e <i>A. niger</i>	20 U mL <sup>-1</sup>	Pham <i>et al.</i> (2010)
<i>A. fumigatus</i> IMI 385708 e <i>A. sojae</i>	482 U mL <sup>-1</sup>	Ozturk, Cekmecelioglu e Ogel (2010)
<i>Penicillium pinophilum</i> C1 e <i>P. pastoris</i>	161 U mL <sup>-1</sup>	Cai <i>et al.</i> (2011)
<i>A. niger</i> LW-1 e <i>P. pastoris</i>	29 U mL <sup>-1</sup>	Li <i>et al.</i> (2012)
<i>Cellulosimicrobium</i> sp. strain HY-13 e <i>Escherichia coli</i>	14711 U mg <sup>-1</sup>	Kim <i>et al.</i> (2011)
<i>A. niger</i> CBS 513.88 e <i>P. pastoris</i>	5069 U mL <sup>-1</sup>	Zhao, Zheng e Zhou(2011)
<i>Chaetomium</i> sp. CQ31 e <i>P. pastoris</i>	50030 U mL <sup>-1</sup>	Katrolia <i>et al.</i> (2012)
<i>Bacillus</i> sp. N16-5 e <i>P. pastoris</i>	2980 U mL <sup>-1</sup>	Zhu <i>et al.</i> (2014)

### 3.5 FORMULAÇÃO E ESTUDOS DE ESTABILIDADE DE PRODUTOS ENZIMÁTICOS

De acordo com Voet e Voet (2006), as enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos (proteínas), unidos de forma covalente por meio de ligações peptídicas. A atividade catalítica, bem como a estabilidade e especificidade da enzima dependem da sua estrutura tridimensional.

Condições ambientais, tais como pH, temperatura e força iônica do meio, afetam a estrutura da enzima e em decorrência, também as suas propriedades (SANT'ANNA JR., 2001).

### 3.5.1 Legislação

No Brasil, o órgão responsável pela legislação e fiscalização de medicamentos, cosméticos e alimentos é conhecido como ANVISA, sigla para Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Entretanto, a ANVISA não propõe um guia único e específico para os estudos de estabilidade de novos produtos.

No Brasil, é de responsabilidade da empresa detentora do produto, avaliar a sua estabilidade antes de colocá-lo à disposição do público. No ato do registro do item, os estudos de estabilidade devem ser anexados a um termo de responsabilidade, o qual declara que a empresa assegura tanto a estabilidade, quanto a eficácia e segurança de seu produto.

Para os produtos alimentícios a legislação brasileira é bastante clara. A Resolução CNS/MS N.º 04, de 24 de novembro de 1988, disponibiliza a lista de aditivos alimentares permitidos bem como seus limites máximos de utilização (ANVISA, 1988).

Mais especificamente, para o uso de enzimas em alimentos, a ANVISA aprovou o documento “Regulamento técnico sobre o uso de enzimas e preparações enzimáticas na produção de alimentos destinados ao consumo humano” (ANVISA, 2005 Consulta Pública nº 93, de 21 de dezembro de 2005 - D.O.U de 22/12/2005). No Anexo I do Regulamento, há uma tabela contendo a origem da enzima, ao passo que o Anexo II aborda a lista de veículos e o Anexo III, a lista de aditivos alimentares que podem ser incorporados às fórmulas (ANVISA, 2005). Tal documento foi emitido baseado em necessidades que se encontram citadas no mesmo, tais como:

- O constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;
- O estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos, com vistas a minimizar os riscos à saúde humana;
- A submissão à adequada avaliação toxicológica, antes de se autorizar o uso de uma substância em alimentos;

- A limitação do uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia, em alimentos e condições específicas e ao menor nível possível para se alcançar o efeito desejado.

No item 4 – Princípios gerais, e no item 5 – Formas de Apresentação, vale destacar:

4.1 A empresa deve ter o cadastro e o controle da composição do produto, a faixa de atividade enzimática e o método analítico empregado para o seu controle.

4.4 As enzimas de origem microbiana devem ser obtidas por métodos e condições que garantam a fermentação controlada e impeçam a introdução de microrganismos capazes de originar substâncias tóxicas ou indesejáveis.

4.5. As enzimas produzidas por microrganismos geneticamente modificados devem ser purificadas, sem formas viáveis dos organismos que as produziram e, ainda, sem traços de material genético (ácidos nucleicos).

4.8. Não devem ser utilizados microrganismos patogênicos para os seres humanos na produção de enzimas.

4.9. As enzimas e preparações enzimáticas não devem contribuir para aumentar a contagem microbiana total do alimento tratado e não podem exceder o limite de contaminação microbiana fixado para o mesmo alimento.

#### 5. Formas de Apresentação

As enzimas e as preparações podem ser apresentadas na forma sólida, pastosa ou líquida.

No Anexo I está listado o Nome da Enzima (ou Complexo Enzimático ou Atividade Principal) e a Fonte da mesma, subdividida em animal, vegetal ou

microbiana. A mananase está presente no tópico das hemicelulases e os microrganismos listados como fonte desta enzima são *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Humicola insolens*, *Streptomyces* sp., *Trichoderma longibrachiatum* e *Trichoderma reesei*.

Nos Estados Unidos o órgão análogo à ANVISA é o FDA, sigla para *Food and Drug Administration*. O site do *United States Department of Health and Human Service*, disponibiliza um guia para consulta pública, intitulado *Guidance for industry: Stability testing of drug substances and products* (FDA, 2013).

Segundo Batista (2014), este guia se baseia nos artigos da *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* - ICH, de modo similar à ANVISA, pois ambos servem como roteiro para os estudos de estabilidade de novos produtos, mas não possuem caráter de obrigatoriedade, permitindo que a empresa estabeleça seus próprios métodos de avaliação e acompanhamento dos produtos.

A ICH é uma comissão formada por autoridades e membros de indústrias farmacêuticas e alimentícias do Japão, Estados Unidos e Europa, que desde 1990 se uniram na tentativa de unificar padrões, técnicas e requisitos para aprovação de drogas e produtos pra consumo humano (ICH, 2014).

Pela importância técnica deste comitê, conforme instruções do FDA, esses documentos também são recomendados para os estudos de estabilidade de alimentos (FDA, 2013).

### 3.5.2 Produtos biológicos e biotecnológicos

De acordo com a ANVISA (2005), produtos biológicos são moléculas complexas de elevada massa molecular, obtidas a partir de fluidos biológicos, tecidos de origem animal ou procedimentos biotecnológicos que utilizam manipulação genética (como a tecnologia do DNA recombinante, mutação física/química ou seleção forçada).

Uma formulação com compostos desta natureza possui características diferenciadas, uma vez que são constituídas principalmente de proteínas e polipeptídeos, os quais devem ser mantidos em adequada conformação para permanência da sua atividade biológica. Além da alta sensibilidade às variações do

ambiente, há também uma maior variação entre os lotes dos produtos de origem biológica e biotecnológica, o que torna a sua padronização mais difícil quando comparados às drogas de origem sintética (MHRA, 2013).

### 3.5.3 Formulação de bioprodutos: Enzimas

A formulação de enzimas ou preparações enzimáticas requer maior atenção devido à sua origem biológica.

Particularmente sensíveis às variações do ambiente, as enzimas podem perder sua atividade em sucessivos processos de purificação e concentração que ocasionam mudanças estruturais e conformacionais, podendo levar à sua inativação (HARRIS; ANGAL, 1989). Assegurar a estabilidade de um produto de origem biológica e biotecnológica é o fator de maior importância no sucesso de sua comercialização (WEIJERS; RIET, 1992; BATISTA, 2014).

De acordo com Colacino e Crichton (1997), as condições extremas comumente empregadas na indústria, aliada à falta de resistência frente a estas condições pode ser um fator limitante para ampliar a aplicação das enzimas, ainda que com considerável especificidade da ação.

Algumas teorias sustentam que a termoestabilidade das enzimas está associada à sua interação com outros componentes celulares, tais como lipídeos e polissacarídeos, que formam uma matriz contra a desnaturação (MOZHAEV; MARTINEK, 1984).

Mozhaev e Martinek (1984) relatam ainda que as enzimas de origem termofílica, quando comparadas às mesmas enzimas de origem mesofílica, possuem características particulares no que se refere à sua estrutura, interação e forma, além de características genéticas associadas aos microrganismos produtores.

Diversas estratégias têm sido estudadas na tentativa de preservar as enzimas da desnaturação e possibilitar maior tempo de vida útil, como por exemplo, a imobilização de enzimas em matrizes naturais ou sintéticas, modificações químicas das moléculas (COSTA *et al.*, 2002; GULLA *et al.*, 2004), modificações genéticas e associação de aditivos em uma formulação (FU *et al.*, 2010).

O uso de aditivos é uma das formas mais acessíveis de se prevenir a ação de agentes químicos e biológicos, além de aumentar a resistência das moléculas a

elevada pressão e temperatura (ATHÈS *et al.*, 1999; GULLA *et al.*, 2004). Substâncias tais como sais, aminoácidos, surfactantes, metil ésteres, compostos metálicos, antibióticos, entre outros, são adicionados ao produto de interesse, onde a escolha dos componentes se associa às características desejadas no produto final (LI *et al.*, 2010; BOURNEOW *et al.*, 2012).

#### 3.5.4 Estudos de estabilidade

Conforme já mencionado, apesar da inexistência de legislação específica, a ANVISA recomenda avaliar o produto formulado quanto à manutenção de suas características ao longo do tempo.

As etapas que envolvem esta avaliação compreendem os estudos de estabilidade. Para tanto, as amostras do produto que se deseja testar devem ser alojadas em frascos com vedação suficiente para evitar perdas de gases e volumes (sem a incorporação de ar ao produto), com *headspace* de um terço do volume do frasco (ANVISA, 2004).

Os estudos de estabilidade dividem-se em três fases: estabilidade acelerada, estabilidade normal e teste de prateleira, descritas a seguir, baseadas na própria ANVISA (2004) e em documentos da ICH (1995) sobre “estabilidade de produtos biológicos e biotecnológicos” e “testes de estabilidade de novas drogas e substâncias” (ICH, 2003).

##### 3.5.4.1 Fase 1: Estabilidade Acelerada

Também conhecido como Teste de Triagem, Teste Preliminar ou de Curto Prazo, avalia diversos parâmetros em condições aceleradas com o objetivo de selecionar os componentes de uma fórmula, verificar incompatibilidades entre os aditivos e avaliar outras características que possam influenciar na qualidade organoléptica do produto final.

O produto deve ser submetido às condições de estresse mais adequadas à sua aplicação, de modo a acelerar sua degradação, com o intuito de avaliar a efetividade do aditivo testado.

As formulações podem ser incubadas em temperaturas altas (37 a 50 °C) ou baixas (-10 a 5 °C), ou ainda forçadas a situações de estresse térmico em ciclos de temperaturas altas e baixas.

Com duração de 15 dias, as avaliações podem ser feitas diariamente ou ao final do período de incubação.

#### 3.5.4.2 Fase 2: Estabilidade Normal

Também conhecida como Estabilidade Exploratória, seu objetivo é “prever” a vida útil da formulação, por meio de condições menos extremas que a primeira fase, e através de lotes maiores ou em escala piloto.

Esta etapa é uma prévia da fórmula e embalagens definitivas, uma vez que os componentes já foram estabelecidos na etapa anterior.

O período de testes recomendado é de até 90 dias, com análises nos dias 1, 7, 15, 30, 60 e 90 dias de incubação, os quais podem variar de acordo com a natureza do produto estudado.

Em geral, nesta etapa é realizada uma bateria completa de análises físico-químicas (pH, viscosidade, densidade, etc.), organolépticas (cor, odor, sabor, aspecto, etc.) e microbiológicas.

#### 3.5.4.3 Fase 3: Teste de prateleira ou *Shelf-life*

Pode também ser denominado Teste de Estabilidade de Longa Duração. Considerado o teste final e realizado em condições reais de armazenamento, pretende comprovar o tempo de duração da bio-atividade do produto final, previsto nas etapas anteriores.

O tempo de estudo é longo e pode durar anos de acordo com o prazo de validade previsto. Também neste estudo são avaliadas as possíveis interações e condições das embalagens.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este item foi dividido em três etapas principais que abrangeram:

- Produção de mananase por via convencional;
- Produção de mananase por via recombinante;
- Formulação líquida de mananases.

A metodologia de cada etapa foi iniciada com seus respectivos fluxogramas acerca dos experimentos realizados.

### PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA CONVENCIONAL

Os experimentos para produção de mananase por via convencional (com o microrganismo *Aspergillus niger* NRRL 328) foram realizados nos laboratórios de Processos Biotecnológicos I e II, do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Federal do Paraná - Campus Centro Politécnico.

Na FIGURA 8 segue um fluxograma geral dos experimentos realizados nestas etapas.

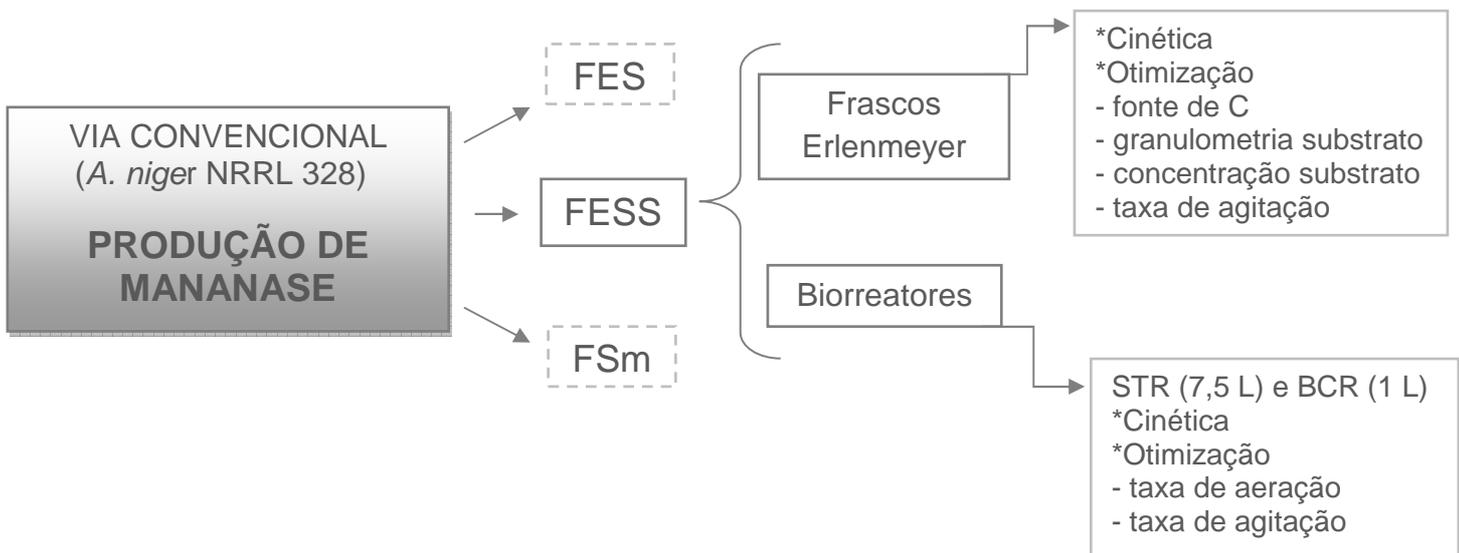


FIGURA 8 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA CONVENCIONAL (*A. niger* NRRL 328)

#### 4.1 MICRORGANISMO

O fungo filamentosso *Aspergillus niger* NRRL 328 foi obtido da Coleção de Culturas do Laboratório de Processos Biotecnológicos I, localizado na Universidade Federal do Paraná – UFPR, Campus Centro Politécnico, em Curitiba. Este microrganismo foi previamente selecionado no trabalho desenvolvido em nível de Mestrado, onde foram testadas diferentes cepas produtoras de mananase (WEINGARTNER, 2010).

O repique da cepa foi realizado a cada 3 meses em meio Ágar Batata Dextrose, solidificado em tubos de ensaio inclinados, com incubação a 28 °C durante 196 horas.

As cepas repicadas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

#### 4.2 PREPARO DO INÓCULO DE *Aspergillus niger* NRRL 328

Utilizou-se alça de platina, devidamente esterilizada, para o cultivo do inóculo de *A. niger* NRRL 328, preparado em profundidade na presença de 50 mL de Ágar *Locust Bean Gum* (LBG) 2% (m/v), distribuído em frascos Erlenmeyer de 250 mL. O LBG ou goma de alfarroba foi selecionado em trabalho anterior (WEINGARTNER, 2010), pois além de proporcionar excelente crescimento do fungo, também o prepara para a produção de mananase devido à sua composição rica em galactomananas.

Após semeadura em profundidade dos esporos de *A. niger* NRRL 328, os frascos foram incubados a 28 °C durante 168 horas.

O inóculo foi obtido por meio da suspensão dos esporos em solução estéril composta por 50 mL de água purificada e Tween 80 0,01%, acrescida de pérolas de vidro e barra magnética e mantida sob agitação vigorosa por 10 minutos.

A concentração de esporos foi determinada por contagem em Câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

A taxa de inóculo empregada foi de  $10^7$  esporos/g de suporte/substrato para os experimentos de FES e de 2% (v/v) para os experimentos de FESS e FS<sub>m</sub>.

### 4.3 RESÍDUO E SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS TESTADOS COMO SUBSTRATOS NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

Foram utilizados nesta etapa um resíduo: cascas de café (“CC”; cedidas pela empresa Café Damasco®), e quatro subprodutos agroindustriais: farelo (FS) e cascas de soja (CS) (ambas cedidas pela empresa Imcopa®), polpa cítrica (PC) (cedida pela empresa Coalma Nutrição Animal) e bagaço de mandioca (BM).

As cascas de café receberam pré-tratamento à base de imersão em hidróxido de potássio 0,25%, seguido por esterilização em autoclave a 100 °C durante 45 minutos (para eliminação de compostos fenólicos), lavagem em água corrente e secagem em estufa a 80 °C durante 24 horas (MACHADO, 2002). Os demais subprodutos não necessitaram de qualquer pré-tratamento.

Todos eles foram triturados em moinho de facas e peneirados manualmente, para obtenção de três diferentes tamanhos de partículas (granulometrias): maior que 2 mm, entre 0,8 e 2 mm, e menor que 0,8 mm.

### 4.4 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SÓLIDO (FES)

O processo de FES foi conduzido em duplicata em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 5 g de CC, CS, FS, BM ou PC (granulometria entre 0,8 e 2 mm) como suporte/substrato.

A taxa de umidade inicial foi ajustada para 70 ou 75% (dependendo da capacidade de absorção de cada material), com a adição do inóculo e água destilada esterilizada. Os frascos foram incubados a 28 °C durante 120 horas.

Para extração da mananase, 5 g de fermentado foram homogeneizados em 50 mL de água deionizada, com auxílio de agitador magnético durante 20 minutos. Esta mistura foi filtrada em papel TNT (“tecido não tecido”) e centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos, seguida por nova filtração do sobrenadante em papel filtro qualitativo. O filtrado foi submetido à determinação da atividade enzimática.

#### 4.5 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO NO ESTADO SEMISSÓLIDO (FESS)

O processo de FESS foi conduzido em duplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 5 g de cada substrato (CC, CS, FS, BM e PC), com tamanho de partícula intermediário (granulometria entre 0,8 e 2 mm).

Foram avaliadas duas concentrações diferentes de substrato em meio líquido (5 e 10%, m/v), preparadas com água destilada esterilizada. Os frascos foram incubados a 28 °C sob agitação de 120 rpm, durante 120 horas.

A mananase foi recuperada do caldo fermentado por filtração em papel filtro qualitativo e centrifugação a 8000 rpm durante 20 minutos para BM e PC, ou durante 10 minutos para os substratos CC, CS, FS. O sobrenadante foi submetido à determinação da atividade enzimática.

#### 4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE MANANASE

Os ensaios para determinação da atividade enzimática foram realizados em triplicata. Alíquotas de 50 µL do filtrado enzimático foram adicionadas à 50 µL de LBG 0,5% (m/v) e incubadas por 10 minutos em banho-maria a 50 °C (modificado de RÄTTÖ; POUTANEN, 1988). Quando necessária, a diluição prévia dos extratos enzimáticos foi realizada em solução tampão citrato de sódio 50 mM pH 5,0.

Os açúcares redutores liberados durante a reação enzimática foram quantificados de acordo com o método de Miller (1959), adaptado: 100 µL do reagente DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) foram pipetados em cada microtubo, os quais foram incubados por 5 minutos em banho-maria a 100 °C.

Após resfriamento em banho de gelo, 500 µL de água purificada foram adicionados a cada microtubo, o qual foi homogeneizado em vórtex. Alíquotas de 250 µL foram transferidas para poços de microplaca com fundo chato.

A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro (540 nm) e os resultados foram expressos em U mL<sup>-1</sup>, onde U (Unidade Internacional), refere-se à quantidade de enzima capaz de formar 1 µmol de produto (manose), por minuto, nas condições experimentais estabelecidas.

#### 4.7 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER

A cinética de produção de mananase pelo fungo filamentososo *A. niger* NRRL 328, utilizando a técnica de FESS, foi realizada em frascos Erlenmeyer por um período total de 168 horas. Para determinar o melhor tempo para interrupção do processo fermentativo, as análises foram realizadas a cada 24 horas.

Os frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 5% de CS na granulometria entre 0,8 e 2 mm, inóculo (2% v/v) e água destilada esterilizada (volume final de 100 mL) foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata.

A mananase foi recuperada do caldo fermentado de acordo com o subitem 4.5 e submetida à determinação da atividade enzimática conforme o subitem 4.6. O pH também foi determinado (método potenciométrico).

#### 4.8 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE FESS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE EM FRASCOS ERLLENMEYER

Definidos os melhores substratos e tempo para interrupção do processo fermentativo, iniciou-se o estudo de otimização da FESS em frascos Erlenmeyer para produção de mananase.

Ao fim de cada condição avaliada, a mananase foi recuperada do caldo fermentado e submetida à determinação da atividade enzimática, de acordo com os subitens 4.5 e 4.6.

##### 4.8.1 Influência das fontes de carbono sobre a produção de mananase em FESS

Diferentes fontes de carbono foram avaliadas de forma a suplementar o meio fermentativo para a produção de mananases. As concentrações destas fontes foram calculadas com base na sua composição em massa.

Glicose (10 g/L), frutose (10 g/L), sacarose (5 g/L), galactose (10 g/L) e glicerol (20 g/L) foram adicionados de modo individual à 100 mL (volume final) de água destilada estéril.

Os frascos de Erlenmeyer de 250 mL (em duplicata), que continham ainda 5% de CS na granulometria menor que 0,8 mm e inóculo (2%, v/v), foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 144 horas.

#### 4.8.2 Estudo da influência do tamanho das partículas de CS sobre a produção de mananase em FESS

O estudo da influência do tamanho das partículas de CS para a produção de mananase foi realizado na concentração de 10% (m/v). Foram estudadas as granulometrias de CS: menor que 0,8 mm, entre 0,8 e 2 mm, e maior que 2 mm.

Nesta etapa, o volume líquido final (100 mL) de água destilada estéril foi substituído por solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e sacarose (20 g/L), com base no trabalho de mestrado realizado por Weingartner (2010), o qual determinou que esta composição de solução nutritiva foi a melhor encontrada para a produção de mananase utilizando CS como substrato.

Os frascos (em duplicata) foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 120 horas.

#### 4.8.3 Estudo do efeito de diferentes taxas de agitação e concentração de CS sobre a produção de mananase em FESS

Para avaliar o efeito das variáveis agitação e concentração de CS sobre a produção de mananase, foi realizado um delineamento experimental do tipo fatorial completo  $3^{(2-0)}$ , com três repetições do ponto central.

A solução nutritiva (volume líquido final de 100 mL) foi composta por uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e sacarose (20 g/L).

Na TABELA 5, estão listadas as variáveis do processo de FESS estudadas em seus diferentes níveis.

TABELA 5 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DA TAXA DE AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	SÍMBOLO	NÍVEIS		
		-1	0	1
Concentração CS (%)	CS	5	10	15
Taxa de Agitação (rpm)	rpm	0	60	120

Os frascos foram incubados a 28 °C durante 120 horas e os resultados analisados com auxílio do *software* Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

#### 4.9 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM BIORREATORES

##### 4.9.1 Produção de mananase por FESS em biorreator do tipo Tanque Agitado – STR

O processo de FESS foi conduzido em biorreator de 7,5 L modelo MDL 750 (B.E. MARUBISHI Thailand Co., Ltd.), agitado por pás planas do tipo Rushton (FIGURA 9).



FIGURA 9 – BIORREATOR MODELO MDL 750 (B. E. MARUBISHI THAILAND Co. Ltda.), UTILIZADO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS  
 FONTE: Salmon (2015)

O ajuste da concentração de CS se fez necessário de modo a evitar sobrecarga na agitação mecânica feita por pás. A concentração de CS foi fixada em 2,5% (m/v), com a adição de 125 g de CS para um volume final líquido de 5 L.

A solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e sacarose (20 g/L) foi acrescentada juntamente com 5 mL de anti-espumante comercial Nitrofoam (Nitrogenius).

Após esterilização em autoclave a 121 °C durante 30 minutos e resfriamento até aproximadamente 30 °C, o tanque cilíndrico foi inoculado com a solução de esporos de *A. niger* NRRL 328 (2%, v/v).

A temperatura foi ajustada em 28 °C e a agitação mecânica em 180 rpm por um período total de 120 horas.

Alíquotas foram retiradas a cada 24 horas e submetidas à filtração em papel filtro qualitativo e centrifugação a 8000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi submetido à determinação da atividade enzimática conforme o subitem 4.6.

Bateladas distintas quanto à aeração forçada foram realizadas com taxas de 3 e 6 L/min.

#### 4.9.2 Produção de mananase por FESS em biorreator do tipo Coluna de Bolhas - BCR

Biorreatores do tipo Coluna de Bolhas (FIGURA 10), desenvolvidos no laboratório de Processos Biotecnológicos I (OLIVEIRA, 2012), foram testados quanto à sua performance para a produção de mananase por FESS.

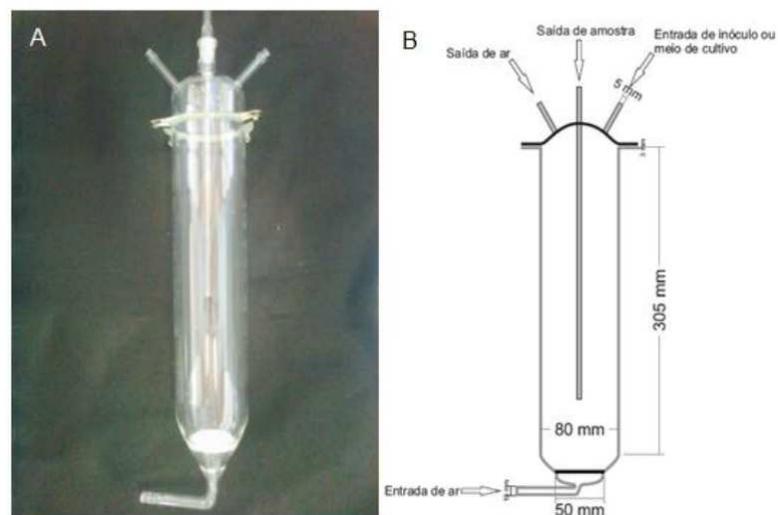


FIGURA 10 – A) BIORREATOR TIPO COLUNA DE BOLHAS PROJETADO NO DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA  
B) PROJETO DO BIORREATOR DE 1,5 L COM RESPECTIVAS MEDIDAS  
FONTE: Oliveira (2012)

Os experimentos foram realizados em duplicata. Em cada coluna foi adicionado 105 g de CS (15%, m/v), na granulometria menor que 0,8 mm, e também solução nutritiva para o volume final líquido de 700 mL.

A solução nutritiva foi composta por uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e sacarose (20 g/L) acrescida de 2 mL de anti-espumante comercial Nitrofoam (Nitrogenius).

Após esterilização em autoclave a 121 °C durante 20 minutos e resfriamento até aproximadamente 30 °C, a solução de esporos de *A. niger* NRRL 328 (2%, v/v), foi injetada na coluna de modo a completar o volume líquido final.

A homogeneização do meio fermentativo se deu por meio da movimentação de bolhas formadas pela injeção de ar estéril a uma taxa de aeração de 1 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). As colunas foram incubadas em câmara com controle de temperatura (28 °C) por 96 horas.

Com auxílio de uma bomba de vácuo, a mananase foi recuperada do caldo fermentado por meio de filtração em papel TNT e posteriormente em papel filtro qualitativo, para separação das células e do substrato em suspensão. Em seguida foi realizada centrifugação de 10000 rpm à 4 °C durante 15 minutos e o sobrenadante foi submetido à determinação da atividade enzimática conforme o subitem 4.6.

#### 4.10 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSm)

##### 4.10.1 FSm em frascos Erlenmeyer com extrato aquoso de CS

O processo de FSm também foi usado para avaliar a produção de mananase. Em frascos Erlenmeyer (250 mL), o meio líquido (volume final de 100 mL) foi composto por uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e extrato aquoso de CS, obtido por meio de fervura das cascas (10%, m/v) em água deionizada durante 30 minutos, seguido por filtração em papel TNT. A taxa de inóculo utilizada foi de 2% (v/v) de solução esporos de *A. niger* NRRL 328.

Os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 144 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Após a FSm, o fermentado foi filtrado em papel filtro qualitativo e centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi então utilizado para determinação da atividade enzimática de acordo com o subitem 4.6.

#### 4.10.2 Otimização do processo de FSm em frascos Erlenmeyer para produção de mananase

Para avaliar as melhores condições para a indução e produção de mananase por FSm, foi realizado um delineamento experimental do tipo composto central rotacional (DCCR), com três repetições do ponto central.

Neste caso, a influência da adição de indutor e fonte de carbono foi testada. Ao meio fermentativo composto por extrato aquoso de CS (50 mL), uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1 g/L), foram acrescentados diferentes concentrações de sacarose e LBG, conforme a TABELA 6.

TABELA 6 - NÍVEIS DAS VARIÁVEIS ESTUDADAS NA OTIMIZAÇÃO DO MEIO FERMENTATIVO PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	SÍMBOLO	NÍVEIS				
		-1,41	-1	0	1	1,41
Sacarose (g/L)	Sac	4,1	5,8	10	14,2	15,9
<i>Locust Bean Gum</i> (g/L)	LBG	1	1,5	2,5	3,5	4

Os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C, durante 144 horas.

Após a FSm, o fermentado foi filtrado em papel filtro qualitativo e centrifugado a 6000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi então utilizado para determinação da atividade enzimática de acordo com o subitem 4.6.

Os resultados foram analisados com auxílio do programa computacional Statistica 5.0 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

## PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE

Os experimentos para produção de mananase por via recombinante (expressão heteróloga com o microrganismo *P. pastoris* GS115) foram realizados nos Laboratórios de Biologia Molecular e Processos Biotecnológicos II (Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia), no Laboratório de Neurobiologia (Departamento de Patologia Básica) e no Laboratório Multi-usuários (Departamento de Bioquímica), da Universidade Federal do Paraná - Campus Centro Politécnico.

Na FIGURA 11 segue um fluxograma geral dos experimentos realizados nesta etapa.

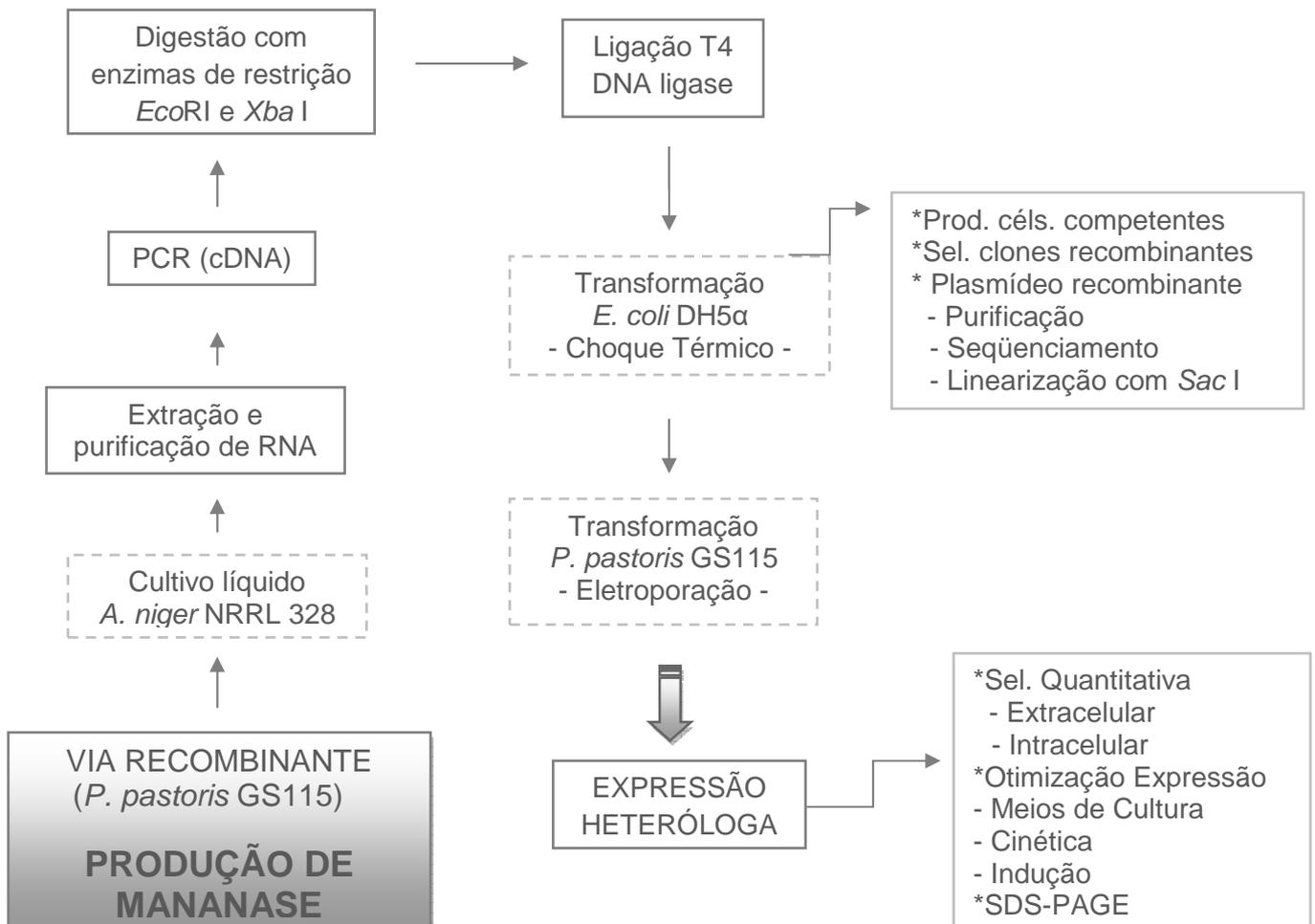


FIGURA 11 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE (EXPRESSÃO HETERÓLOGA COM *P. pastoris* GS115)

#### 4.11 CULTIVO EM MEIO SINTÉTICO DA CEPA PARENTAL *A. niger* NRRL 328 PARA AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MANANASE NATIVA

Para fins comparativos acerca da produção de mananase nativa e recombinante, foi realizado cultivo em meio de cultura sintético denominado meio basal (TABELA 7) conforme Mandels e Andreotti (1978), suplementado com LBG (5 g/L) utilizando frascos de Erlenmeyer (250 mL) e a cepa parental *A. niger* NRRL 328 (taxa de inóculo de 2%, v/v).

Os experimentos foram conduzidos em triplicata e os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 168 horas, com determinação da atividade de mananase a cada 24 horas, de acordo com o subitem 4.6.

TABELA 7 – COMPOSIÇÃO DO MEIO BASAL  
COMPOSIÇÃO POR L

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,4 g
Urea	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,3 g
CaCl <sub>2</sub>	0,3 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	5 mg
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,6 mg
ZnSO <sub>4</sub>	1,4 mg
CoCl <sub>2</sub>	2 mg

FONTE: Mandels e Andreotti (1978)

#### 4.12 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL DA CEPA PARENTAL *A. niger* NRRL 328

Para realizar a extração do RNA total de *A. niger* NRRL 328, o fungo foi cultivado em frascos Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de Caldo Czapeck Extrato de Levedura (TABELA 8), em duplicata.

Os frascos foram incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 72 horas.

TABELA 8 - COMPOSIÇÃO DO CALDO CZAPEK EXTRATO DE LEVEDURA  
COMPOSIÇÃO (g/L)

COMPOSIÇÃO (g/L)		COMPOSIÇÃO (g/L)	
Sacarose	30	NaNO <sub>3</sub>	30
Extrato de Levedura	5	KCl	5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5
Czapek concentrado	10 mL	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
		ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,1
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,05

Após 72 horas, 5 *pellets* foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de extrato aquoso de CS preparado conforme o subitem 4.10.1.

Em duplicata, os frascos foram novamente incubados sob agitação de 120 rpm a 28 °C durante 72 horas.

Após incubação total de 144 horas, o micélio de *A. niger* NRRL 328 foi transferido para microtubos novos e estéreis, lavado (5x) com solução de dietilpírcarbonato (DEPC) 0,1%, e centrifugado a 12000 rpm durante 15 minutos.

A solução DEPC 0,1%, utilizada para evitar possíveis contaminações por RNAses, foi preparada com água ultrapura, homogeneizada em agitador magnético à temperatura ambiente *overnight* e esterilizada em autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

O micélio fúngico tratado com DEPC 0,1% foi então congelado (-20 °C durante 24 horas e -80 °C durante 48 horas) e, posteriormente, liofilizado.

O micélio tratado e liofilizado (90 mg) foi macerado em nitrogênio líquido para extração do RNA total.

#### 4.13 PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL DA CEPA PARENTAL *A. niger* NRRL 328 PARA OBTENÇÃO DO RNA MENSAGEIRO

O RNA total, extraído do micélio da cepa parental *A. niger* NRRL 328, foi submetido à purificação para obtenção do RNA mensageiro, utilizando o kit RNeasy® Plant (QIAGEN, 2012).

A quantificação do RNA mensageiro purificado foi realizada espectrofotometricamente (260 nm) em NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

#### 4.14 PRIMERS E REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA

Os *primers* sintetizados pela Invitrogen™ (TABELA 9) utilizados na PCR para obtenção do cDNA, foram desenhados com base na sequência de RNAm que codifica a endo-β-1,4-mananase no fungo filamentoso *A. niger* BK 01 (GenBank: FJ268574.1), a qual foi considerada homóloga à mananase produzida por *A. niger* NRRL 328, identificada em trabalho anterior (WEINGARTNER, 2010).

TABELA 9 – PRIMERS SINTETIZADOS PARA A EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE

NOME	SEQUENCIA 5'--- 3'	NMOLES	TM (°C)
ManCL2F	CTG TGC <u>GAA TTC</u> <sup>a</sup> TCC TTC GCC AGC ACC TCC G	34,4	100
ManCL2R	CTG TGC TCT <u>AGA</u> <sup>b</sup> GCA CTA CCA ATA GCA GCA ACA TGA TCC	31,1	116

<sup>a</sup>Sítio de ligação da enzima de restrição *EcoRI*

<sup>b</sup>Sítio de ligação da enzima de restrição *Xba I*

O RNA mensageiro, purificado na etapa anterior, foi utilizado como molde para amplificação do cDNA pela PCR, de acordo com as instruções do fabricante do kit QIAGEN® OneStep Reverse Transcriptase-PCR (QIAGEN, 2011).

TABELA 10 – REAÇÃO DE PCR PARA SÍNTESE DO cDNA

ORDEM	COMPONENTE	VOLUME/REAÇÃO (µL)
2º	RT-PCR <i>Buffer</i> 5x	5
3º	dNTP <i>mix</i> (10 mM cada)	1
4º	<i>Primer F</i> (0,6 µM)	0,75
5º	<i>Primer R</i> (0,6 µM)	0,75
1º	RNase-free water	8,5
6º	RT-PCR <i>enzyme mix</i>	1
	RNA diluído (2 µL + 6 µLRNase-free water)	8
	Total	25

Obs.: Foi realizado um controle negativo da reação sem a adição de RNA

A reação de PCR foi realizada no termociclador Applied Biosystems® Veriti® 96-Well Thermal Cycler. Os parâmetros utilizados estão descritos na TABELA 11; Foram realizados 30 ciclos com três diferentes temperaturas de anelamento, baseadas na faixa sugerida pelo kit (50 – 68 °C) e na T<sub>m</sub> dos *primers* utilizados.

TABELA 11 - PARÂMETROS DE TERMOCICLAGEM UTILIZADOS NA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO cDNA

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA (°C)
Transcrição reversa	30 min	50
Ativação inicial da PCR	15 min	95
Desnaturação	30 s	94
Anelamento	30 s	58, 60 e 62
Extensão	1 min	72
Extensão final	10 min	72

Ao final da PCR foi realizada eletroforese em gel de agarose para confirmar a amplificação do cDNA.

#### 4.15 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

A eletroforese em gel de agarose foi realizada de acordo com Sambrook e Russel (2001), na concentração 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA 1x.

A amostra (5 µL) foi diluída em tampão de amostra (2 µL) e, posteriormente, aplicada no poço do gel de agarose. O padrão de massa molecular utilizado (4 µL) foi de 1 Kb (DNA Ladder - Invitrogen™).

A corrida eletroforética foi realizada em sistema horizontal modelo LCH 7x8 (Loocus Biotecnologia) com tensão de voltagem 80 V por aproximadamente 2 horas.

O gel foi corado com brometo de etídio por 15 minutos e descorado em água ultrapura por 8 minutos. A captura de imagem foi feita sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX modelo I.pix (Loocus Biotecnologia).

#### 4.16 PREPARO DO INSERTO PARA CLONAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

##### 4.16.1 Vetor: plasmídeo pPICZ $\alpha$ A

No estudo da produção de mananase recombinante o vetor utilizado foi o plasmídeo pPICZ $\alpha$  A (Invitrogen™). Este vetor (FIGURA 12) foi escolhido por permitir a expressão da proteína recombinante em elevados níveis, sob indução por metanol (promotor *AOX1*), em diferentes linhagens de *P. pastoris*. Além disso, possui o sinal  $\alpha$ -factor (para secretar a proteína recombinante), o gene de resistência à zeocina (que permite a seleção tanto em *E. coli* quanto em *P. pastoris*), e um epitopo c-myc seguido por cauda de polihistidina que permite detectar e purificar a proteína recombinante (LIFE TECHNOLOGIES, 2010).

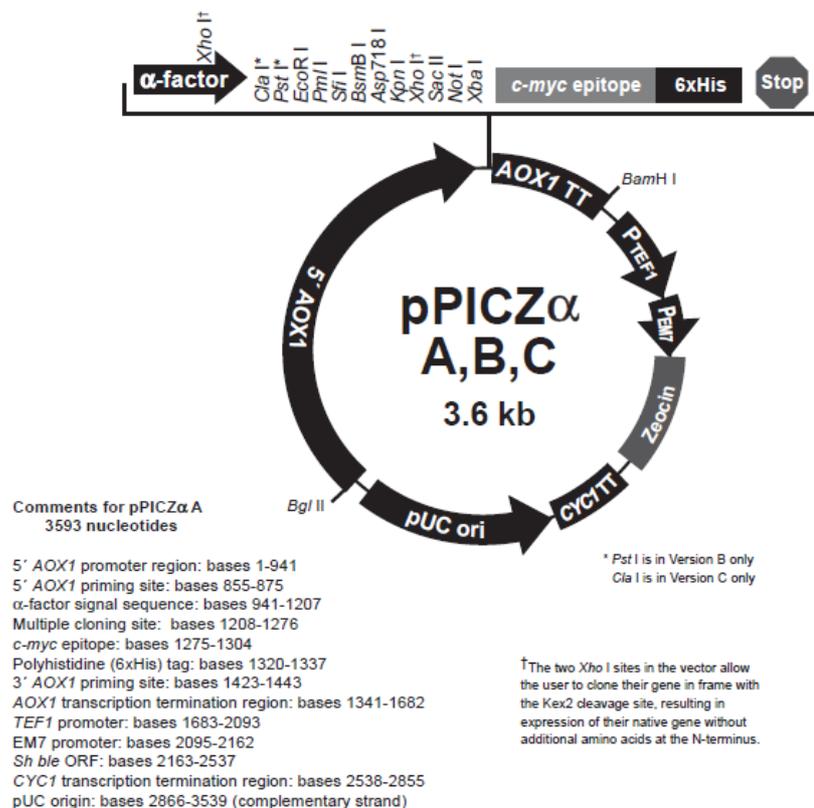


FIGURA 12 - DIAGRAMA DO PLASMÍDEO pPICZ $\alpha$  A  
 FONTE: pPICZ $\alpha$  A, B, and C - USER MANUAL Cat. Nº V195-20 (LIFE TECHNOLOGIES, 2010)

#### 4.16.2 Digestão enzimática do cDNA e plasmídeo pPICZ $\alpha$ A com enzima de restrição *Eco*RI

O produto da PCR (cDNA) foi purificado utilizando o kit illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification, segundo as instruções do fabricante (GE HEALTHCARE, 2008).

A concentração de DNA foi determinada por método espectrofotométrico (NanoVue™ Plus Spectrophotometer - GE Healthcare). Uma alíquota do material purificado foi estocada a -20 °C.

Em triplicata, o cDNA e o plasmídeo pPICZ $\alpha$  A foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI 5000 U (Thermoscientific), de acordo com as TABELAS 12 e 13.

TABELA 12 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR (cDNA)  
COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *EcoRI*

COMPONENTE	VOLUME/REAÇÃO (µL)
Água ultrapura	37
10X <i>EcoRI Buffer</i>	5
Produto da PCR: cDNA (~ 0,5 µg)	6
<i>EcoRI</i>	2
Volume total em cada microtubo	50

TABELA 13 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pPICZα A  
COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *EcoRI*

COMPONENTE	VOLUME/REAÇÃO (µL)
Água ultrapura	42
10X <i>EcoRI Buffer</i>	5
Plasmídeo pPICZα A (0,5 – 1 µg/µL)	1
<i>EcoRI</i>	2
Volume total em cada microtubo	50

Após agitação branda e centrifugação a 4 °C no modo *spin*, os microtubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 16 horas.

#### 4.16.3 Digestão enzimática do cDNA e plasmídeo pPICZα A com enzima de restrição *Xba I*

O produto da PCR (cDNA) e o plasmídeo pPICZα A digeridos com a enzima de restrição *EcoRI* (Thermoscientific), foram novamente purificados utilizando o kit *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification*, segundo as instruções do fabricante (GE HEALTHCARE, 2008). A concentração de DNA foi novamente determinada por método espectrofotométrico em 260 nm (*NanoVue™ Plus Spectrophotometer* - GE Healthcare). Uma alíquota do material purificado foi estocada a -20 °C.

Em triplicata, o cDNA e o plasmídeo pPICZα A já digeridos (*EcoRI*) e purificados, foram então submetidos a nova reação de digestão, porém agora com a enzima de restrição *XbaI* 1500 U (Thermoscientific), conforme as TABELAS 14 e 15.

TABELA 14 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PRODUTO DE PCR (cDNA)  
COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Xba* I

COMPONENTE	VOLUME/REAÇÃO (μL)
Água ultrapura	23
10X <i>Buffer</i> Tango	5
Produto da PCR: cDNA digerido 1x	20
<i>Xba</i> I	2
Volume total em cada microtubo	50

TABELA 15 - REAÇÃO PARA DIGESTÃO DO PLASMÍDEO pPICZα A  
COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Xba* I

COMPONENTE	VOLUME/REAÇÃO (μL)
Água ultrapura	23
10X <i>Buffer</i> Tango	5
Plasmídeo pPICZα A digerido 1x	20
<i>Xba</i> I	2
Volume total em cada microtubo	50

Após agitação branda e centrifugação a 4 °C no modo *spin*, os microtubos foram incubados em estufa a 37 °C durante 16 horas.

Para confirmar a digestão dos fragmentos foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, nas condições já descritas no subitem 4.15.

#### 4.16.4 Ligação do inserto no vetor com T4 DNA ligase

Os fragmentos de DNA plasmidial e do inserto (cDNA), digeridos com as enzimas de restrição *Eco*RI e *Xba* I, foram purificados mais uma vez utilizando o kit *illustra*<sup>TM</sup> GFX PCR DNA and Gel Band Purification, segundo as instruções do fabricante (GE HEALTHCARE, 2008). A união destes fragmentos foi realizada pela T4 DNA Ligase (Promega) na quantidade de moléculas de plasmídeos e insertos de 1:3, conforme a TABELA 16.

TABELA 16 - REAÇÃO PARA UNIÃO DO INSERTO DE INTERESSE NO VETOR ESCOLHIDO (pPICZ $\alpha$  A)

COMPONENTE	VOLUME / REAÇÃO ( $\mu$ L)
Vetor digerido (100 ng)	11
Insero (cDNA) digerido (225 ng)	19
Ligase 10X <i>Buffer</i>	5
T4 DNA Ligase	1
Nuclease <i>free-water</i>	14
Volume total	50

Obs.: Foi realizado um controle negativo da reação apenas com o vetor, sem adição do inserto.

Após agitação branda e centrifugação a 4 °C no modo *spin*, os microtubos, foram incubados sob refrigeração a 4 °C *overnight*.

#### 4.17 CLONAGEM DO PLASMÍDEO RECOMBINANTE

A bactéria *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foi selecionada para clonagem do plasmídeo recombinante devido à sua disponibilidade no laboratório. Suas células se tornaram competentes e foram transformadas por choque térmico de acordo com metodologia disponível em Sambrook, Fritschi e Maniatis (1989), descrita a seguir.

##### 4.17.1 Produção de células competentes – *E.coli* DH5 $\alpha$

Foi realizado um cultivo prévio de *E. coli* DH5 $\alpha$  em placas de Petri com meio Ágar *Low Salt* Luria-Bertani (LB) preparado de acordo com a TABELA 17. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas.

TABELA 17 - MEIO DE CULTURA <i>LOW SALT</i> LB	
COMPOSIÇÃO	g/L
Triptona	10
NaCl	5
Extrato de Levedura	5
Ágar (em caso de meio sólido)	15

Cinco colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , previamente isoladas pela técnica de espalhamento com aça de Drigalsky, foram transferidas com auxílio de aça de platina para tubos Falcon de 50 mL contendo 10 mL de caldo *Low Salt* LB. Os tubos foram incubados sob agitação de 180 rpm a 37 °C durante aproximadamente 3 horas ( $A_{600} = 0,5$ ). Os ensaios foram realizados em duplicata.

Em seguida, os tubos foram centrifugados (3000 xg) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular re-suspendido em 20,0 mL de solução gelada de cloreto de magnésio 0,1 M.

Procedeu-se nova centrifugação (3000 xg) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular re-suspendido em 20 mL de solução gelada de cloreto de cálcio 0,1 M. Os tubos foram incubados a 4 °C durante 30 minutos.

A última centrifugação (3000 xg) também foi realizada a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular re-suspendido em 1 mL de solução gelada de cloreto de cálcio 0,1 M.

Foram feitas 10 alíquotas de 100  $\mu$ L das células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Uma delas foi utilizada na transformação por choque térmico e as demais congeladas a -80 °C (estoque).

#### 4.17.2 Transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$ – Choque térmico

Para replicar o inserto de interesse e, assim, confirmar a ligação do cDNA no vetor escolhido (plasmídeo pPICZ $\alpha$  A), as células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  foram transformadas pela técnica de choque térmico (SAMBROOK; FRITSCHI; MANIATIS, 1989).

Foram adicionados a 20  $\mu$ L de células competentes, 5 ng (0,5  $\mu$ L) de inserto. Um controle negativo foi realizado com a adição de 5 ng do plasmídeo pPICZ $\alpha$  A vazio (sem o cDNA).

Os microtubos foram submetidos à agitação branda por inversão e incubados conforme a TABELA 18.

TABELA 18 - TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

CONDIÇÃO	TEMPO
Gelo	30 min
42 °C (banho-maria)	90 s
Gelo	2 min

Em seguida, foi adicionado 200 µL de meio LB a cada microtubo. Estes foram incubados sob agitação de 180 rpm a 37 °C durante 2 horas.

Alíquotas de 50 e 100 µL das células transformadas foram espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri com Ágar *Low Salt* LB, suplementado com 25 µg/mL de zeocina (antibiótico ao qual o vetor possui resistência).

As placas foram incubadas ao abrigo da luz (uma vez que a zeocina é fotossensível) a 37 °C *overnight*.

#### 4.17.3 Seleção dos clones recombinantes - *E. coli* DH5α

Os clones recombinantes foram selecionados pelo método fenol/clorofórmio. Três colônias transformadas com o inserto e três colônias transformadas com o plasmídeo vazio foram analisadas.

As colônias escolhidas com auxílio de ponteira amarela estéril foram transferidas para microtubos contendo 15 µL de fenol/clorofórmio e 15 µL de tampão de amostra. Os microtubos foram agitados gentilmente e centrifugados a 14000 rpm durante 4 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 15 µL) foi aplicado diretamente nos poços do gel de agarose 0,8 %. A corrida eletroforética e análise foram realizadas nas condições já descritas no subitem 4.15.

#### 4.17.4 Propagação dos clones recombinantes (*E. coli* DH5α) e extração dos plasmídeos recombinantes

Para propagar os clones, uma parte das colônias selecionadas (três com o inserto e três com o plasmídeo vazio) foi estriada com alça de platina em placas de

Petri com Ágar *Low Salt* LB, suplementado com 25 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas ao abrigo da luz a 37 °C *overnight*.

A outra parte das colônias isoladas foi transferida para tubos Falcon com 5 mL de caldo *Low Salt* LB suplementado com 25 µg/mL de zeocina. Os tubos foram incubados sob agitação a 300 rpm ao abrigo da luz a 37 °C durante 12 horas.

Após este período, alíquotas de 500 µL foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (2 L) com 500 mL de caldo *Low Salt* LB suplementado com 25 µg/mL de zeocina. Os frascos foram incubados sob agitação (300 rpm) ao abrigo da luz, a 37 °C por 12 horas.

Os plasmídeos foram extraídos segundo as informações do fabricante do QIAGEN Plasmid Maxi Kit - Cat. n° 12162 (QIAGEN, 2012b).

Para confirmar a presença do inserto nos plasmídeos extraídos, foi realizada uma digestão dupla com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I* conforme a TABELA 19.

TABELA 19 - DIGESTÃO DUPLA DOS PLASMÍDEOS EXTRAÍDOS	
COMPONENTE	VOLUME / REAÇÃO (µL)
Água ultrapura	13,5
10X <i>Tango Buffer</i> (2X <i>Tango Buffer</i> )	4
DNA plasmidial (0,5 – 1,0 µg/µL)	1
<i>EcoRI</i>	0,5
<i>Xba I</i>	1
Volume total	20

Após agitar gentilmente os microtubos e centrifugá-los a 4 °C no modo *spin*, os mesmos foram incubados a 37 °C durante 16 horas.

A eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada nas condições já descritas no subitem 4.15.

#### 4.18 SEQUENCIAMENTO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES

Os plasmídeos recombinantes (vazio e com inserto) tiveram seu DNA sequenciado com a utilização do kit BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) conforme a TABELA 20.

TABELA 20 - REAÇÃO DO DNA POR BIGDYE® TERMINATOR V3.1  
READY REACTION CYCLE SEQUENCING

COMPONENTE	VOLUME / REAÇÃO (µL)
Big Dye	2
Tampão de sequenciamento 2,5x	3
DNA (250 – 300 ng)	14
<i>Primer*</i> (5 pmol)	0,5
Água ultrapura	0,5
Volume total	20

\*A reação foi realizada para cada *primer* (F e R), de modo individual

Para a termociclagem (30 ciclos) foi utilizado o Mastercycler® Eppendorf®; Os parâmetros estão descritos na TABELA 21.

TABELA 21 - PARÂMETROS DE TERMOCICLAGEM UTILIZADOS NO SEQUENCIAMENTO  
DOS PLASMÍDEOS

ETAPA	TEMPO	TEMPERATURA (°C)
Desnaturação inicial	1 min	96
Desnaturação	15 s	96
Anelamento	15 s	50
Extensão	4 min	60

Ao final da termociclagem as amostras foram purificadas pela técnica de precipitação com álcool isopropílico.

Foram adicionados 40 µL de isopropanol 75% às amostras, seguido por agitação branda e incubação em temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram centrifugadas a 13000 rpm durante 20 minutos seguido por remoção do isopropanol.

Adicionou-se 200 µL de etanol 70% às amostras, as quais foram centrifugadas a 13000 rpm durante 5 minutos. O etanol foi removido e as amostras foram secas em temperatura ambiente e entregues ao Laboratório Multi-usuário do Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica – UFPR, para realização de sequenciamento dos plasmídeos recombinantes no sequenciador Applied Biosystems® 3500.

As sequências de DNA obtidas foram analisadas individualmente pelo programa Chromas lite v 2.1.1 da Technelysium e submetidas ao *software* online Blast-n do NCBI para identificação por similaridade.

#### 4.19 LINEARIZAÇÃO DOS PLASMÍDEOS RECOMBINANTES COM *Sac* I

Seguindo as instruções do pPICZ $\alpha$  A, B, and C - *User Manual* Cat. N<sup>o</sup> V195-20 (LIFE TECHNOLOGIES, 2010), antes de proceder à transformação de *P. pastoris* para expressão heteróloga da proteína recombinante, os plasmídeos recombinantes (vazio e com inserto) foram linearizados com enzima de restrição *Sac* I de acordo com a TABELA 22.

COMPONENTE DO MIX REACIONAL	VOLUME / REAÇÃO ( $\mu$ L)
Água ultrapura estéril	7
10X <i>Buffer</i> L	2
DNA plasmidial (20 $\mu$ g)	10
Enzima de restrição <i>Sac</i> I	1
Volume total	20

Após agitação branda e centrifugação no modo *spin*, os microtubos foram incubados a 37 °C durante 5 horas.

A reação foi inativada por incubação a 65 °C durante 20 minutos.

Para comprovar a linearização foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%, nas condições já descritas no subitem 4.15.

##### 4.19.1 Purificação dos plasmídeos linearizados

Para purificar os plasmídeos linearizados, 25  $\mu$ L de clorofane (fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1) foram adicionados às amostras, seguido por agitação branda e centrifugação a 10000 xg durante 5 minutos.

Uma fração do sobrenadante (90%) foi transferida para novos microtubos com adição de igual volume de clorofil, seguido por agitação branda e centrifugação a 10000 xg durante 5 minutos.

90% do sobrenadante foram novamente transferidos para novos microtubos e, considerando este volume equivalente, adicionou-se acetato de sódio 3 M pH 5,2

(em qsp para concentração final de 0,3 M) e 0,7 volumes de isopropanol em temperatura ambiente.

Após agitação branda, os microtubos foram centrifugados a 10000 xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado com cuidado e o *pellet* preservado foi lavado com 1 mL de etanol 70% em temperatura ambiente, seguido por última centrifugação a 10000 xg durante 5 minutos.

O sobrenadante foi descartado com cuidado e o *pellet* preservado foi seco em temperatura ambiente *overnight*.

No dia seguinte, os plasmídeos recombinantes e purificados (vazio e inserto) foram re-suspendidos em 5 µL de água ultrapura e quantificados espectrofotometricamente (260 nm) no NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare).

#### 4.20 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE POR *Pichia pastoris* GS115

A escolha da levedura *P. pastoris* para expressão eucariótica da mananase recombinante, se deu baseada nas suas muitas vantagens, tais como, o processamento e enovelamento de proteínas, a possibilidade de modificações pós-traducionais e o fato de poderem ser cultivadas em meios de cultura baratos (CHEN *et al.*, 2007). Além disso, a utilização do promotor AOX1 nesta levedura, o qual é fortemente induzido por metanol, tem permitido a produção eficiente de várias enzimas de interesse industrial (RODRÍGUEZ; MULANEY; LE, 2000; BRUNEL *et al.*, 2004; COLAO *et al.*, 2006).

As células da *P. pastoris* GS115 utilizada neste trabalho, se tornaram competentes e foram transformadas por eletroporação segundo as informações dispostas no pPICZα A, B, and C – *User Manual* Cat. Nº V195-20 (LIFE TECHNOLOGIES, 2010).

Os procedimentos e meios de cultura, utilizados nos estudos de expressão heteróloga da mananase recombinante, foram baseados no *User Guide Pichia Expression* Cat. Nº K1710-01 (LIFE TECHNOLOGIES, 2014), para expressão de proteínas recombinantes em *Pichia pastoris*.

#### 4.20.1 Produção de células competentes – *P. pastoris* GS115

Para obter colônias isoladas de *P. pastoris* GS115, a mesma foi estriada com o auxílio de alça de platina, em placas de Petri com meio Ágar *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) (TABELA 23). As placas foram incubadas a 30 °C durante 96 horas.

COMPOSIÇÃO	g/L
Extrato de Levedura	10
Peptona	20
Dextrose 2%	100 mL*
Ágar (em caso de meio sólido)	15

\*100 mL da solução estoque de Dextrose 20%, esterilizada previamente por microfiltração.

As colônias isoladas de *P. pastoris* GS115 foram cultivadas em tubos Falcon de 50 mL com 5 mL de caldo YPD. Os tubos foram incubados a 30 °C *overnight*. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Frascos de Erlenmeyer (2 L) contendo 500 mL de caldo YNB fresco, foram inoculados com 0,5 mL da cultura anterior. Os frascos foram novamente incubados a 30 °C *overnight* (D.O.<sub>600</sub> = 1,3 – 1,5).

As células foram separadas por centrifugação (1500 xg) a 4 °C durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas re-suspendidas em 500 mL de água destilada estéril e gelada. Este procedimento foi repetido mais uma vez com re-suspensão das células precipitadas em 250 mL de água destilada, estéril e gelada.

Nova centrifugação foi realizada (1500 xg) a 4 °C durante 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células precipitadas foram re-suspendidas em 20 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado. Este procedimento foi repetido mais uma vez, com re-suspensão final em 1 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado.

#### 4.20.2 Transformação por eletroporação – *P. pastoris* GS115

Em ambiente asséptico, próximo à chama do bico de Bunsen, foram adicionados 5 µL (~10 µg) de plasmídeos linearizados (vazio e inserto) à 80 µL de

células de *P. pastoris* GS115 competentes. Após homogeneização, esta mistura foi transferida para cubetas de eletroporação de 0,2 cm geladas.

As cubetas de eletroporação contendo as células foram incubadas no gelo por 5 minutos. Em seguida foram transferidas para o eletroporador (BIORAD) e pulsadas de acordo com os parâmetros para leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), sugerido pelo fabricante do equipamento.

Imediatamente, próximo ao bico de Bunsen, foi adicionado às cubetas 1 mL de sorbitol 1 M estéril e gelado. O conteúdo das cubetas foi transferido para um tubo Falcon estéril (15 mL) que foi incubado a 30 °C durante 1 hora.

Em câmara de fluxo laminar devidamente asséptica, foi adicionado 1 mL de caldo YPD a cada tubo Falcon. Estes foram incubados sob agitação de 200 rpm a 30 °C durante 1 hora.

Alíquotas de 50, 100 e 200 µL das células transformadas foram espalhadas com alça de Drigalski em placas de Petri com Ágar YPD suplementado com sorbitol 1 M e 100 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas ao abrigo da luz a 30 °C durante 96 horas.

#### 4.21 SELEÇÃO QUANTITATIVA DOS CLONES DE *P. pastoris* TRANSGÊNICOS

Algumas colônias pré-selecionadas foram inoculadas pontualmente em placas de Petri com Ágar YPD suplementado com sorbitol 1 M e 1000 µg/mL de zeocina. As placas foram incubadas ao abrigo da luz a 30 °C durante 96 horas.

As colônias que cresceram nesta maior concentração de zeocina (1000 µg/mL) foram escolhidas para o estudo de seleção.

Colônias transformadas com o plasmídeo vazio (sem o inserto), também foram testadas como controle negativo.

##### 4.21.1 Seleção extracelular

O pré-inóculo foi preparado com uma parte de cada colônia transferida para microtubos com 250 µL de *Buffered Glicerol-complex Medium* (BMGY), preparado conforme a TABELA 24.

COMPOSIÇÃO (1 L)	%
Extrato de levedura	1
Peptona	2
YNB	1,34
Biotina	4x10 <sup>-5</sup>
Glicerol	1
Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0	qsp

Os microtubos tiveram as tampas perfuradas e foram incubados sob agitação de 180 rpm a 29 °C durante 24 horas (D.O.<sub>600</sub> = 2 - 6)

No dia seguinte, estes foram centrifugados (2500 rpm) a 21 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de células re-suspendido em 600 µL de *Buffered Methanol-complex Medium* (BMMY), preparado de acordo com a TABELA 25. Este volume foi dividido em 2 para obtenção da duplicata.

COMPOSIÇÃO (1 L)	%
Extrato de levedura	1
Peptona	2
YNB	1,34
Biotina	4x10 <sup>-5</sup>
Metanol	0,5
Fosfato de potássio 100 mM pH 6,0	qsp

<sup>a</sup> BMMY: sem adição de fosfato de potássio

<sup>b</sup> BMMY/LBG: com adição de 0,5% de *Locust Bean Gum*

Os microtubos tiveram as tampas perfuradas e foram incubados sob agitação (210 rpm) a 29 °C durante 96 horas, com adição de metanol em concentração final de 2%, a cada 24 horas.

Ao fim das 96 h, os microtubos foram centrifugados (1500 xg) a 4 °C durante 10 minutos. O precipitado foi congelado -20 °C (análise intracelular) e o sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de mananase conforme o subitem 4.6.

#### 4.21.2 Seleção intracelular

A fração precipitada contendo as células foi descongelada em gelo e re-suspendida em tampão de lise celular (10:1; v/v), preparado conforme a TABELA 26.

COMPOSIÇÃO (1 L)	%
Fosfato de sódio 50 mM, pH 7,4	qsp
Fenilmetilsulfonilfluorídrico (PMSF) 1 mM	qsp
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM	qsp
Glicerol	5

Pérolas de vidro (0,5 mm) lavadas em solução ácida foram adicionadas aos tubos. As células foram rompidas com 8 ciclos de agitação em vórtex seguido por incubação em gelo, com duração de 30 segundos em cada etapa.

Por fim, foi realizada centrifugação (9000 rpm) a 4 °C durante 10 minutos, com análise do sobrenadante quanto à atividade mananólítica (subitem 4.6).

## 4.22 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE RECOMBINANTE

### 4.22.1 Seleção de meio de cultura e estudo cinético da expressão de mananase recombinante

O pré-inóculo das colônias selecionadas na etapa anterior foi preparado em frascos Erlenmeyer (250 mL) fechados frouxamente com gaze e papel pardo contendo 50 mL de caldo BMGY (TABELA 24).

Três diferentes meios de cultura foram testados à partir das sugestões do guia para expressão em *Pichia pastoris* (LIFE TECHNOLOGIES, 2014). O inóculo foi feito em 25 mL de meio BMMY (TABELA 25), MMY (preparado conforme a TABELA 25, porém sem adição de solução tamponante) e BMMY/LBG (preparado conforme a TABELA 25, e suplementado com 0,5% de *Locust Bean Gum*). Todos os frascos foram incubados sob agitação de 225 rpm a 30 °C durante 96 horas, com adição de metanol em concentração final de 1% a cada 24 horas.

Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas nos tempos 6, 12, 18, 24, 36 e 48 horas, e centrifugadas (1500 xg) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de mananase conforme o subitem 4.6.

#### 4.22.2 Co-indução com sorbitol e estudo cinético

A mesma colônia, selecionada na etapa anterior, foi utilizada neste estudo realizado em frascos Erlenmeyer (250 mL) fechados frouxamente com gaze e papel pardo.

O pré-inóculo foi preparado em 100 mL de caldo BMGY (TABELA 24) e o inóculo em 50 mL de caldo BMMY (TABELA 25), suplementado com 1, 3 ou 5% (m/v) de sorbitol. Todos os frascos foram incubados sob agitação de 150 rpm a 20 e 30 °C durante 96 horas, com adição de metanol em concentração final de 1% (v/v) a cada 24 horas.

Alíquotas de 5 mL foram retiradas a cada 24 horas e centrifugadas (1500 xg) a 4 °C durante 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da atividade de mananase conforme o subitem 4.6 e o precipitado congelado para posterior rompimento e análise do conteúdo intracelular (subitem 4.21.2).

### 4.23 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA SÓDIO DODECIL SULFATO (SDS-PAGE)

A análise eletroforética em SDS-PAGE foi realizada de acordo com Laemmli (1970), em gel de separação 12,5% (m/v), com 1 mm de espessura, produzido a partir de uma solução de acrilamida:bis-acrilamida 30:1.

A amostra foi precipitada com acetona de acordo com Cunningham *et. al.* (1988). Para cada 1 volume de amostra foi adicionado 10 volumes de acetona, seguido por incubação em banho de gelo por 45 minutos e centrifugação a 12000 xg durante 30 minutos à 4 °C.

Os *pellets* foram secos em estufa à vácuo a 35 °C e re-suspendidos em tampão de amostra.

O marcador molecular utilizado foi o modelo 26630 (Thermoscientific), com 11 proteínas de massa molecular conhecida: 250, 150, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 15, 10 e 5 kDa.

Após aplicação das amostras e do marcador no gel, foi realizada corrida eletroforética em 150 V. O gel foi corado com azul de Coomassie R-250.

## FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE MANANASE

O estudo da formulação líquida de mananase foi realizado com o extrato enzimático obtido por via convencional (FESS com o microrganismo *A. niger* NRRL 328 em biorreator do tipo BCR). Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios de Processos Biotecnológicos I e II, do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná - Campus Centro Politécnico.

Na FIGURA 13 segue um fluxograma geral das etapas desenvolvidas nesta última fase do trabalho.

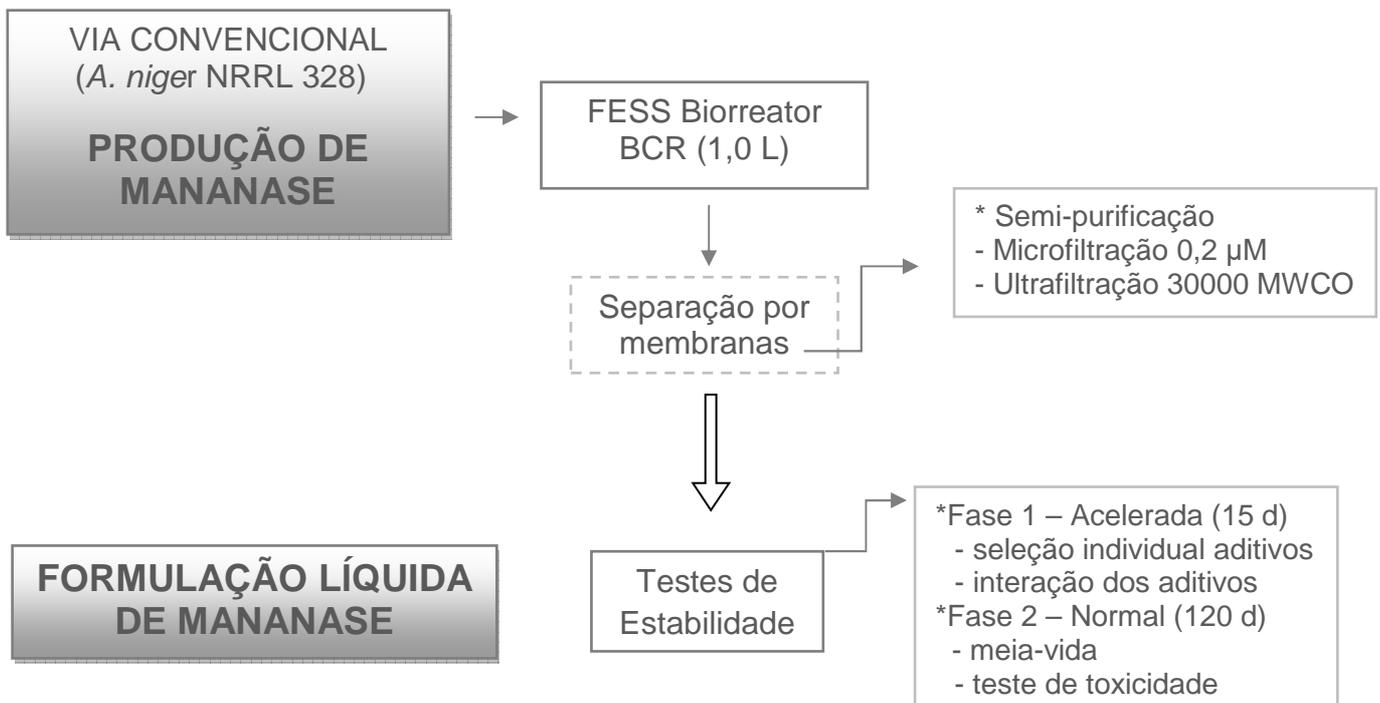


FIGURA 13 - FLUXOGRAMA GERAL DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS NOS ESTUDOS DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE MANANASE

## 4.24 ESTUDOS PARA DETERMINAÇÃO DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA ENZIMA MANANASE

### 4.24.1 Separação por membranas do extrato mananolítico

Como etapa preliminar de purificação da enzima mananase, cuja massa molecular está em torno de 45 kDa, foram realizadas separações por membrana do extrato bruto enzimático, a fim de separar as proteínas produzidas de forma concomitante por *A. niger*, e assim obter frações com predominância de mananases.

O sobrenadante clarificado, proveniente da FESS em biorreator do tipo BCR, foi microfiltrado (0,2 µm) e posteriormente ultrafiltrado a 6000 rpm durante 10 minutos em ultrafiltro Vivaspin® 6 (GE Healthcare) de 30000 MWCO (*molecular weight cut-off*). A fração retida na ultrafiltração foi denominada extrato mananolítico semi-purificado, sendo o mesmo utilizado em todos os testes relacionados à formulação líquida da mananase.

### 4.24.2 Estabilidade acelerada (Fase1): seleção individual dos aditivos para compor a formulação líquida de mananase

Para os estudos de formulação líquida que visam a manutenção da atividade de mananase em longo prazo, foi realizada uma pré-seleção de aditivos escolhidos com base na RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988 (ANVISA, 1988) e na literatura (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Os aditivos foram testados em duas concentrações distintas [C1] e [C2], dentro da faixa máxima permitida (TABELA 27).

TABELA 27 – CONCENTRAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1) PARA COMPOR A FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA MANANASE

SEQUÊNCIA DE ESTUDO	ADITIVO	[C1]	[C2]
GRUPO 1	Cloreto de sódio	1%	0,1%
	Citrato de sódio	1,5%	0,15%
	Sorbato de potássio	0,5%	0,05%
	Benzoato de sódio	1%	0,1%
GRUPO 2	Glicerol	3,5 M	2,5 M
	Sorbitol	3,5 M	2,5 M
	PEG 8000	3%	2%
	Ác. Benzóico	0,1%	0,01%
GRUPO 3	Metionina	1,5%	0,5%
	Ác. etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	0,1%	0,01%
	Ác. ascórbico	0,1%	0,01%
	Coquetel inibidor de protease*	1:2	1:4

\* Coquetel comercializado como *Protease Inhibitor Cocktail Animal Component Free for general use* (Catalog Number I3911, SIGMA-ALDRICH)

As concentrações estudadas foram calculadas para um volume final de 30 mL: 15 mL de solução com o aditivo e 15 mL de extrato mananolítico semi-purificado (fração retida em 30000 MWCO).

Os frascos com 1/3 de *headspace* foram incubados em estufa a 50 °C, por um período total de 15 dias, com análises nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias. Frascos sem a presença de aditivos foram incubados nas mesmas condições como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A determinação da atividade de mananase foi comparada à obtida no tempo 0 e expressa em atividade residual (%).

#### 4.24.3 Estabilidade acelerada (Fase 1): estudo da interação dos aditivos selecionados

Os melhores aditivos selecionados individualmente foram analisados quanto à sua interação.

As concentrações foram escolhidas com base no resultado da avaliação individual dos aditivos e geraram duas diferentes interações, dispostas na TABELA 28.

TABELA 28 - DIFERENTES INTERAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1) PARA A FORMULAÇÃO LÍQUIDA DE MANANASE

ADITIVOS	INTERAÇÃO 1	INTERAÇÃO 2
Citrato de sódio	0,5%	0,15%
Glicerol	3,5 M	2,5 M
EDTA	0,1%	0,01%

As concentrações estudadas foram calculadas para um volume final de 30 mL: 15 mL de solução com o aditivo e 15 mL de extrato mananolítico semi-purificado (fração retida em 30000 MWCO).

Os frascos com 1/3 de *headspace* foram incubados em estufa a 50 °C, por um período total de 15 dias, com análises nos tempos 0 e 15 dias. Frascos sem a presença de aditivos foram incubados nas mesmas condições como controle negativo. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

A determinação da atividade de mananase foi comparada à obtida no tempo 0 e expressa em atividade residual (%).

#### 4.24.4 Estabilidade normal (Fase 2)

A melhor formulação em termos de aditivos e concentração foi avaliada quanto à sua efetividade na manutenção da atividade de mananase ao longo do tempo, em condições reais de armazenamento.

As concentrações estudadas foram calculadas para um volume final de 30 mL: 15 mL de solução com o aditivo e 15 mL de extrato mananolítico semi-purificado (fração retida em 30000 MWCO).

Os frascos com 1/3 de *headspace* foram armazenados ao abrigo da luz em temperatura ambiente e sob refrigeração (4 °C), por um período total de 120 dias, com análises a cada 15 dias. Dois frascos sem a presença de aditivos foram incubados nas mesmas condições como controle negativo.

A determinação da atividade de mananase foi comparada à obtida no tempo 0 e expressa em atividade residual (%).

#### 4.24.5 Determinação da meia-vida da mananase

Para estimar a meia-vida da mananase, o extrato semi-purificado (fração retida em 30000 MWCO) foi pré-incubado em banho-maria a 50 e 60 °C, por um período de 20 minutos. Alíquotas de 2 mL foram retiradas nos tempos 0, 5, 10, 15 e 20 minutos para determinação da atividade de mananase conforme o subitem 4.6.

A taxa de inativação térmica pelo tempo foi determinada de acordo com a reação de primeira ordem obtida através das equações (1) e (2):

$$%A = \%A_0 e^{-kt} \quad (1)$$

$$\ln(\%A/\%A_0) = -kt \quad (2)$$

onde,  $A_0$  = atividade enzimática inicial e  $A$  = atividade enzimática residual.

A constante  $k$  foi calculada como o coeficiente angular de inclinação da reta obtida, representando graficamente o logaritmo natural ( $\ln$ ) da porcentagem de atividade enzimática residual ( $\%A$ ), em relação ao tempo de pré-incubação (ANGELO, 1995).

Portanto, a meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da enzima foi obtida através da equação:

$$t_{1/2} = 0,693/k \quad (3)$$

#### 4.24.6 Teste de toxicidade da formulação líquida de mananase – *Artemia salina*

A fim de determinar os limites de concentração para aplicação da formulação líquida de mananase, a mesma foi avaliada quanto à sua toxicidade frente ao organismo teste *Artemia salina* (SOLIS *et al.*, 1993).

Por se tratar de um organismo de fácil manutenção e de ampla distribuição, o microcrustáceo *Artemia salina* - Linnaeus, 1758 (FIGURA 14), tem sido largamente utilizado em testes de toxicidade (MARTIN; DAVIS, 2001).

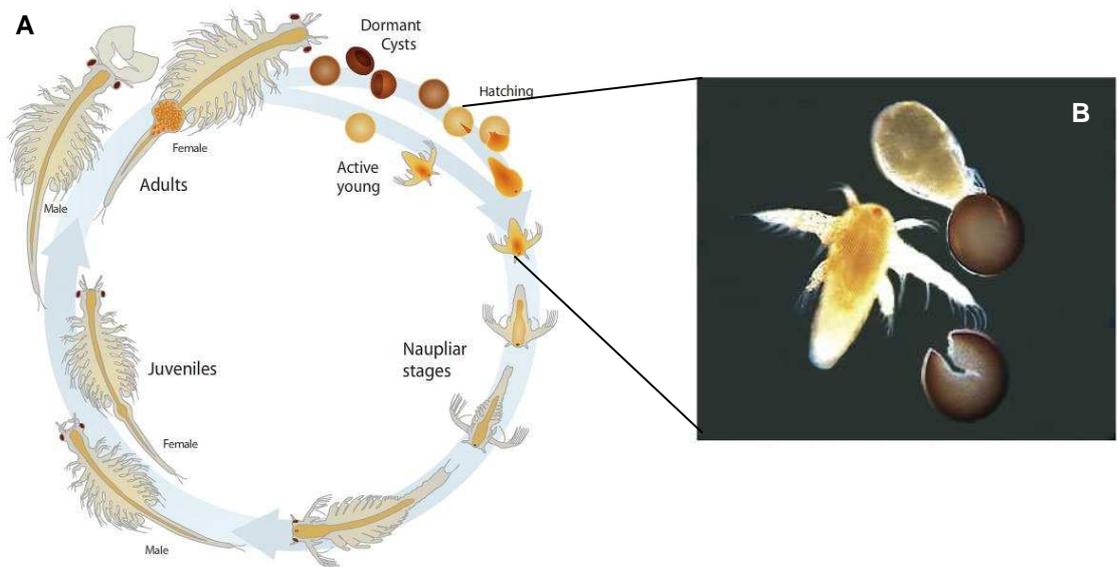


FIGURA 14 – A) CICLO DE VIDA DA *Artemia salina*  
 B) CISTOS EM ECLOSÃO E FASE LARVAL (NAUPLIOS) DE *Artemia salina*  
 FONTE: A) Arachnoboards (2010); B) Mayorga *et al.* (2010)

O teste com *A. salina* consistiu na eclosão dos cistos em solução salina pH 8,5 em temperatura ambiente durante 24 horas sob luz artificial, seguido por exposição dos náuplios (10 unidades) na fase II ou III durante 24 horas à concentrações crescentes da amostra (formulação líquida de mananase): 0,5%, 0,75%, 1%, 2% e 5% (VEIGA; VITAL, 2002; CETESB, 1987). O controle negativo foi realizado com exposição dos náuplios à solução salina livre de qualquer formulação líquida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Ao final do período de exposição (24 horas) foi realizada contagem do número de organismos mortos e vivos para determinação da  $CL_{50}$  (concentração letal para 50%) com intervalo de confiança de 95%, segundo o método *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

O programa computacional TSK na versão 1.5 (USEPA, 1990) foi utilizado para tratamento dos dados.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PRODUÇÃO DE MANANASES POR DIFERENTES TÉCNICAS DE FERMENTAÇÃO: FES E FESS

Visando a implantação de processo industrial para produção de enzimas, será apresentado a seguir o estudo realizado para comparação entre as duas técnicas de fermentação, sólida e semissólida, o qual objetivou averiguar a utilização desta última para o escalonamento do processo produtivo de mananases.

#### 5.1.1 Produção de mananases por FES com diferentes substratos em frascos Erlenmeyer

Neste trabalho, a FES foi testada quanto à sua efetividade na produção de mananases utilizando outros substratos/suportes para comparação com a CS: farelo de soja (FS), polpa cítrica (PC), bagaço de mandioca (BM) e casca de café (CC), pois além do apelo à sustentabilidade, o substrato ideal também deve apresentar baixo custo e características que viabilizarão o processo produtivo, seja em escala laboratorial ou industrial.

De acordo com a FIGURA 15, a CS aparece como melhor substrato/suporte para a produção de mananase por FES ( $455,64 \text{ U mL}^{-1}$  ou  $2491,75 \text{ U g}^{-1}$  de matéria seca). Os demais substratos não foram efetivos ( $12,45$ ;  $2,54$  e  $0,14 \text{ U mL}^{-1}$  utilizando PC, BM e CC, respectivamente). Apesar do FS ter sido responsável pelo segundo melhor índice de produção da enzima ( $66,20 \text{ U mL}^{-1}$ ), o mesmo não propiciou sequer a metade da produção alcançada com a CS.

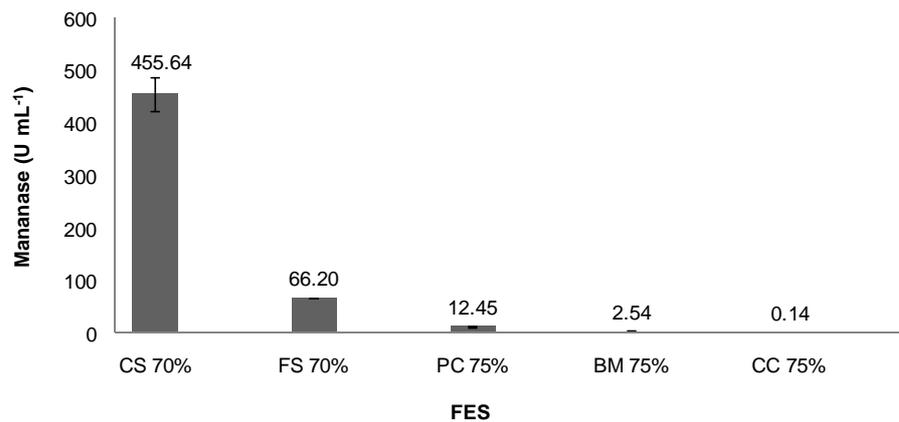


FIGURA 15 - PRODUÇÃO DE MANANASE POR FES EM FRASCOS ERLLENMEYER UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS

CS 70% - cascas de soja com 70% de umidade inicial, FS 70% - farelo de soja com 70% de umidade inicial, PC 75% - polpa cítrica com 75% de umidade inicial, BM 75% - bagaço de mandioca com 75% de umidade inicial, CC 75% - cascas de café com 75% de umidade inicial

As cascas de soja consistem da primeira camada que cobre o grão, sendo um dos subprodutos obtidos no processo de extração de óleo. Para cada tonelada de soja processada, até 3% de cascas são geradas (ZAMBOM *et al.*, 2001).

Em pesquisa anterior, a CS foi selecionada como o melhor substrato/suporte (dentre cascas de café e bagaço de cana-de-açúcar) para a produção de mananases por FES. Na sua composição, o elevado teor de açúcares totais (74,3 g/L), além de percentual de fibra bruta de 65% e pH naturalmente ácido (5,5), propiciaram excelente crescimento do fungo e elevada produção da enzima (WEINGARTNER, 2010). Além disso, a CS apresenta baixo teor de lignina (4%) e considerável teor de celulose (40%) e hemicelulose (20%), sendo que esta última fração é compreendida por aproximadamente 10% de  $\beta$ -mananas (em base de matéria seca), ao passo que no FS, o teor deste polissacarídeo é de apenas 1,8% (ELANCO, 2012; SARROUH *et al.*, 2014).

Na literatura, a produção de mananase pela técnica de FES com a utilização de subprodutos como suporte/substrato foi relatada por Heck, Soares e Ayub (2005), os quais utilizaram resíduo fibroso de soja com solução nutritiva, atingindo índices de 0,540 U mg<sup>-1</sup> de mananase obtidos pela bactéria *Bacillus circulans*. Baldrian *et al.* (2005) reportam 114,7 mU g<sup>-1</sup> de mananase, por *Pleurotus ostreatus* em colunas de vidro preenchidas com palha de trigo e solução nutritiva. Magalhães e Milagres (2009) utilizaram pedaços de *Pinus taeda* em biorreator de leito estático com o microrganismo *Ceriporiopsis subvermisporea* para produzir 0,25 U g<sup>-1</sup> de mananase,

enquanto Cha *et al.* (2010) produziram níveis mais elevados da enzima ( $60 \text{ U g}^{-1}$ ) com *A. niger* em farelo de soja e solução nutritiva. O resultado aqui obtido,  $2491 \text{ U g}^{-1}$  de matéria seca, com a utilização de CS e *A. niger*, está entre os mais expressivos para a produção de mananase pela técnica de FES.

Outras enzimas vêm sendo produzidas por fungos filamentosos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Sua importância é tamanha que o coloca como a maior fonte fúngica produtora de enzimas e organismo modelo para o seu estudo (HOLKER *et al.*, 2004). Entretanto, como descrito na TABELA 29, diferentes índices de produção de enzimas por fungos, podem decorrer das diferenças metabólicas encontradas, ao se utilizar diferentes técnicas fermentativas, como por exemplo, FES e FSm (HOLKER *et al.*, 2004; SUBRAMANIYAM; VIMALA, 2012).

TABELA 29 – PRODUÇÃO DE ENZIMAS POR DIFERENTES CEPAS DE *Aspergillus niger* EM FES E FSm

ENZIMA	PRODUÇÃO		REFERÊNCIA
	FES	FSm	
Esterase	20,0 nkat/mg dry wt.	0,4 nkat/mL	Ashter <i>et al.</i> (2002)
Lipase	630 IU/g dry wt.	18 IU/mL	Mahadik <i>et al.</i> (2002)
Fitase	884 U/g	-	Papagianni, Nokes e Filek (2001)
Poligalacturonase	2,28 U/L	0,48 U/L	Maldonado <i>et al.</i> (1998)
Tanase	12000 IU/L	2500 IU/L	Aguilar <i>et al.</i> (2001)

FONTE: Adaptado de Subramaniyam e Vimala (2012)

### 5.1.2 Produção de mananase por FESS com diferentes substratos em frascos Erlenmeyer

Para a produção de mananase são desconhecidos relatos na literatura que tenham utilizado a técnica de FESS, elevando consideravelmente a relevância deste trabalho, onde a FESS foi testada com o intuito principal de facilitar o escalonamento do processo para nível industrial, ou seja, com o uso de biorreatores do tipo tanque agitado (STR) ou coluna de bolhas (BCR).

Uma vez que o processo fermentativo é incomum, os subprodutos utilizados com a técnica de FES foram novamente testados, inicialmente na concentração de 5% (m/v), onde mais uma vez a CS se destacou na produção de mananase ( $42,36 \text{ U mL}^{-1}$ ). CC, PC e BM assim como já ocorrido com no processo fermentativo sólido,

não apresentaram desempenho satisfatório para a produção de mananase por FESS, na concentração de 5% (m/v) (FIGURA 16).

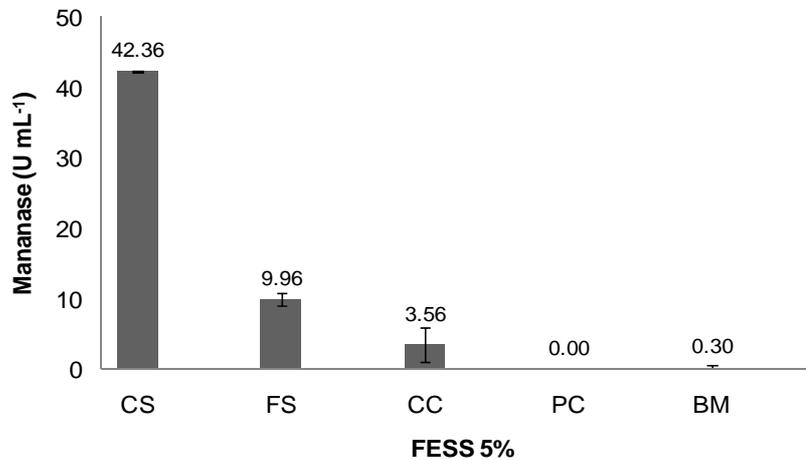


FIGURA 16 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS COMO SUBSTRATO (5%, m/v)  
CS - cascas de soja, FS - farelo de soja, CC - cascas de café, PC - polpa cítrica, BM - bagaço de mandioca

A principal característica da FESS é a presença de partículas sólidas em suspensão e, portanto, surge como uma alternativa para o uso de subprodutos agroindustriais como substrato, sem a necessidade de pré-tratamento químico ou enzimático comuns aos processos FSm.

A técnica de FESS é relatada na produção de outras enzimas tais como: lacase, utilizando palha de cevada em conjunto com pedaços de esponja de nylon e o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (RODRÍGUEZ *et al.*, 1997); ou bagaço de cana, por *Panus tigrinus* (GONÇALVEZ; ESPOSITO; BENAR, 1998) e também farelo de trigo, por *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* (OSMA *et al.*, 2011); lignina e manganês-peroxidase, obtidas por *Phanerochaete chrysosporium* em sementes de uva, palha de trigo, aparas de madeira (RODRÍGUEZ-COUTO; DOMÍNGUEZ; SANROMÁN, 2001) e também em palha de arroz pelo mesmo microrganismo (ZENG *et al.*, 2015); e celulase e  $\beta$ -glicosidase produzidas na Índia a partir da FESS de biomassa aquática (*Eicchornia crassipes*) pelo fungo *A. niger* (KUMAR; SINGH, 2001).

Outros bioprodutos também são reportados a partir da FESS, como por exemplo, biodiesel, obtido à partir da fermentação de sorgo por *Mortierella isabellina* (ECONOMOU *et al.*, 2010) e o antibiótico neomicina, produzido por *Streptomyces*

*fradiae* num mix de sólidos em suspensão composto por cascas de laranja e cubos de esponja (MACHADO; TEIXEIRA; RODRÍGUEZ-COUTO, 2013).

Na tentativa de elevar a produção da mananase, a FESS foi realizada novamente com todos os subprodutos, porém em maior concentração, 10% (m/v). Nesta condição, o FS foi o substrato que proporcionou a maior produção da enzima ( $43,79 \text{ U mL}^{-1}$ ), seguido pela CS ( $29,51 \text{ U mL}^{-1}$ ); CC, PC e BM continuaram com o pior desempenho, ainda que em maior concentração (10%, m/v) (FIGURA 17).

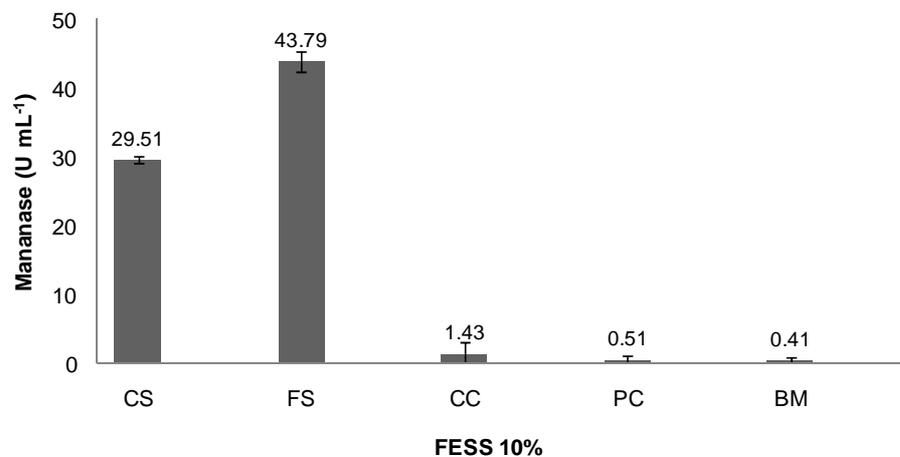


FIGURA 17 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER UTILIZANDO DIFERENTES SUBPRODUTOS COMO SUBSTRATO (10%, m/v)

CS - cascas de soja, FS - farelo de soja, CC- cascas de café, PC - polpa cítrica, BM - bagaço de mandioca

A queda na produção de mananase por FESS, quando utilizada maior concentração do substrato CS, pode estar relacionada à heterogeneidade inerente aos subprodutos agroindustriais.

Para definir o melhor subproduto à ser empregado na FESS para a produção de mananases, a fermentação foi realizada novamente com os melhores substratos em suas melhores concentrações estudadas até o momento: CS 5% e FS 10%. A CS forneceu a melhor resposta em termos de produção e produtividade da mananase, mesmo quando utilizada em menor quantidade (5%, m/v) (TABELA 30).

TABELA 30 - MÉDIA DE PRODUÇÃO E PRODUTIVIDADE DE MANANASE EM FESS COM CS 5% (m/v) E FS 10% (m/v)

FESS	PRODUÇÃO MÉDIA (U mL <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE MÉDIA (U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
CS 5%	46,12	9,22
FS 10%	37,28	7,45

Conforme discutido anteriormente, a CS possui composição mais interessante para a produção de mananases. Além disso, seu custo (R\$ 340,00/t) é 31% inferior ao custo do FS (R\$ 1100,00/t) (ALCANCE PECUÁRIA, 2015); o Brasil figura como segundo maior produtor mundial de soja, e o estado do Paraná é responsável por aproximadamente 17% desta produção, distribuída em 5 milhões de hectares (EMBRAPA SOJA, 2015).

Portanto, o maior índice de atividade enzimática proporcionado pela CS, em conjunto com a sua composição mais interessante, baixo custo e facilitada aquisição devido à sua abundância, fez com que este fosse o subproduto selecionado para a produção de mananases por via convencional utilizando a técnica de FESS.

#### 5.1.2.1 Cinética da produção de mananase por FESS em frascos Erlenmeyer

A fim de encontrar o período ideal para interromper o processo fermentativo e determinar a melhor produção de mananase, foi realizado um estudo cinético durante 168 horas, com análises da atividade de mananase e determinação do pH a cada 24 horas.

De acordo com o a FIGURA 18, o pico de produção de mananase ocorreu em 144 horas ( $30 \text{ U mL}^{-1}$ ) e o pH do caldo fermentado variou de levemente ácido a levemente alcalino (5,4 – 8,0); Nestas condições a produtividade foi de  $0,21 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A partir de 144 horas, com o aumento de pH próximo à alcalinidade, iniciou-se a inativação da enzima, perdendo-se 11% da atividade enzimática.

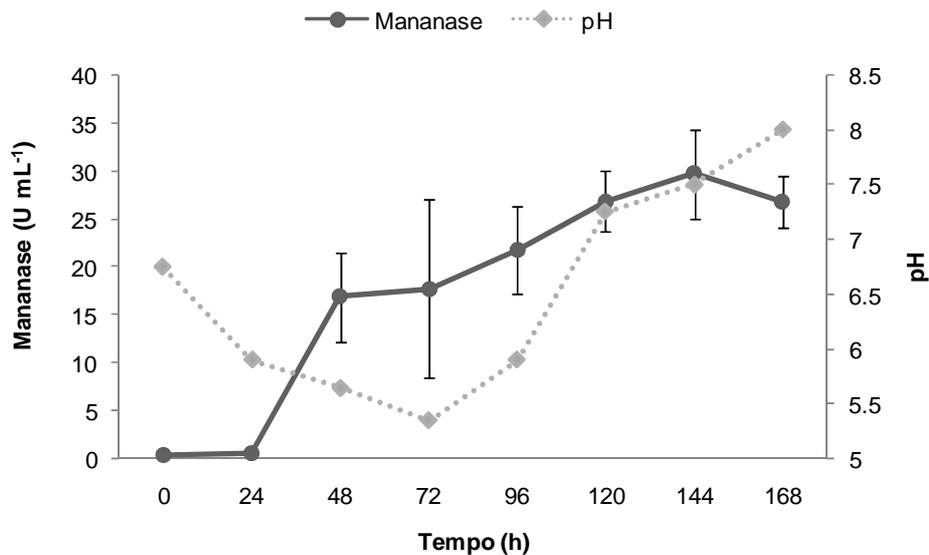


FIGURA 18 – CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (5%, m/v) EM FRASCOS ERLLENMEYER

## 5.2 OTIMIZAÇÃO DE CONDIÇÕES QUÍMICAS E FÍSICAS DA PRODUÇÃO DE MANANASES POR FESS

Em processos industriais, é sempre necessário melhorar o desempenho do sistema por meio do aumento de rendimento e redução do custo de produção (OZTURK; CEKMECELIOGLU; OGEL, 2010).

O crescimento do microrganismo e a produção da enzima são fortemente influenciados pela composição do meio e por fatores externos (pH, temperatura, agitação, etc.); assim a otimização destes parâmetros é a principal tarefa para o aprimoramento da relação custo-benefício na produção da enzima por processo biotecnológico (DJEKRIF-DAKHMOCHE *et al.*, 2006).

### 5.2.1 Produção de mananases por FESS com diferentes fontes de carbono

Foi avaliado o efeito da suplementação do meio de CS com diferentes fontes de carbono. Glicerol (20 g/L), frutose (10 g/L), glicose (10 g/L), sacarose (5 g/L) e galactose (10 g/L) foram as fontes testadas, sendo que a produção de mananase com frutose, sacarose ou galactose (27,88; 31,15 e 29,92 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente),

foram superiores ao controle (24,23 U mL<sup>-1</sup>), fermentado apenas com água destilada e CS (FIGURA 19).

Segundo Mohamad *et al.* (2011), o fungo *A. niger* é capaz de se desenvolver em fontes de carbono variadas porém, a habilidade de produzir mananase, é fortemente influenciada pela fonte de carbono utilizada.

Apesar da semelhança apresentada pelo uso de galactose ou sacarose, esta última foi a fonte de carbono selecionada para complementar a solução nutritiva, em função de seu melhor resultado em termos de atividade enzimática e também de seu baixo custo, cerca de R\$ 28,00/Kg (SIGMA-ALDRICH, 2015).

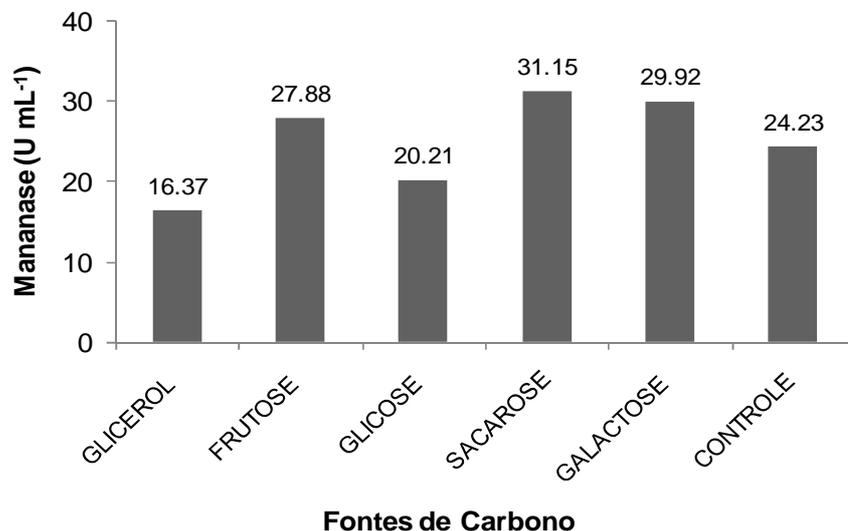


FIGURA 19 – INFLUENCIA DE DIFERENTES FONTES DE CARBONO SOBRE A PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (5%, m/v)

### 5.2.2 Produção de mananases por FESS com diferentes tamanhos de partícula de CS

Em geral, um fator que influencia tanto o processo de FES quanto o de FESS é o tamanho da partícula do substrato. Sendo assim, a CS foi testada na concentração de 5% (m/v), em três frações distintas: menor que 0,8 mm, entre 0,8 e 2 mm e maior que 2 mm, suplementada com sacarose, uréia e sulfato de managanês, sob agitação de 120 rpm.

De acordo com o gráfico da FIGURA 20, o menor tamanho de partícula de CS (inferior a 0,8 mm) foi responsável pela maior atividade de mananase (65,06 U mL<sup>-1</sup>).

Os outros tamanhos de partícula, entre 0,8 e 2 mm e superior a 2 mm, levaram a produção de mananase à níveis de 49,18 e 51,96 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A diferença na atividade enzimática entre estas duas condições não foi significativa, apresentando média de 50,57 U mL<sup>-1</sup>, ou seja, em torno de 23% inferior à obtida com a melhor condição estabelecida até o momento para a produção de mananase por FESS.

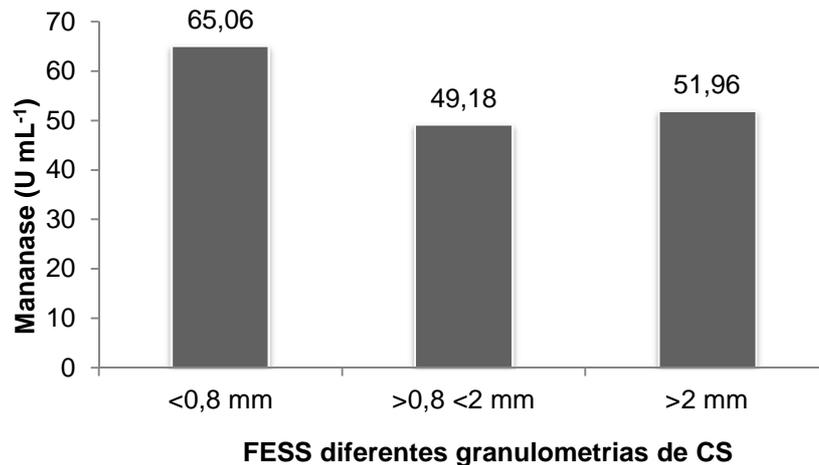


FIGURA 20 – INFLUÊNCIA DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE CS NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS (5%, m/v)

O incremento na produção de mananase pode ser explicado pela substituição da água destilada por solução nutritiva composta por uréia e sulfato de managanês, otimizada em trabalho desenvolvido durante o mestrado (WEINGARTNER, 2010), conforme já relatado no item Material e Métodos (subitem 4.8.2). Além disso, as partículas menores do substrato empregado na FESS propiciaram maior área superficial, facilitando a transferência de massa e assim, o consumo mais eficiente dos nutrientes pelo fungo.

### 5.2.3 Delineamento experimental 3<sup>(2-0)</sup> para otimização da FESS com diferentes taxas de agitação (rpm) e concentração do substrato (% CS)

O efeito de diferentes concentrações de CS, com partículas menores que 0,8 mm e diferentes velocidades de agitação, foi avaliado em um delineamento fatorial completo 3<sup>(2-0)</sup> com 3 pontos centrais.

As variáveis independentes decodificadas e também as respostas em termos de atividade enzimática podem ser observadas na TABELA 31. A variável velocidade de agitação (rpm) também foi testada no nível zero o que representa a condição estática.

Com a utilização de 15% (m/v) de CS sob agitação de 60 e 120 rpm, a atividade enzimática chegou a 57,18 e 76,86 U mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Tal fato demonstra que a produção de mananase é favorecida pela maior agitação (120 rpm) e alta concentração de substrato no meio (15% m/v).

TABELA 31 - RESPOSTAS E VARIÁVEIS DECODIFICADAS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 3<sup>(2-0)</sup>, PARA AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE DIFERENTES VELOCIDADES DE AGITAÇÃO (rpm) E CONCENTRAÇÕES DE CASCAS DE SOJA (% m/v) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLLENMEYER

	CASCAS DE SOJA (%)	AGITAÇÃO (rpm)	MANANASE (U mL <sup>-1</sup> )
1	5	0	27,83
2	5	60	39,92
3	5	120	30,38
4	10	0	48,05
5	10	60	44,83
6	10	120	41,17
7	15	0	47,73
8	15	60	57,18
9	15	120	76,86
10 C	10	60	42,69
11 C	10	60	43,98
12 C	10	60	38,29

Em frascos Erlenmeyer a aeração ocorre por difusão. Sendo assim, a adequada agitação leva a uma maior difusão da aeração, com elevada taxa de transferência de oxigênio, o que favorece o crescimento do fungo e a produção de enzimas.

De acordo com o Diagrama de Pareto (FIGURA 21), os dois fatores estudados (velocidade de agitação e concentração de CS) foram significativos, bem como algumas interações lineares e quadráticas entre os mesmos. É possível observar ainda que o aumento no nível dos fatores estudados favoreceria a produção de mananase. Contudo, por razões operacionais, não foi possível aumentar a velocidade de agitação. Ainda, concentrações de CS acima de 15% (m/v) descaracterizariam o estado semissólido do processo fermentativo e

dificultariam a agitação em volumes maiores, utilizados nos biorreatores testados na sequência.

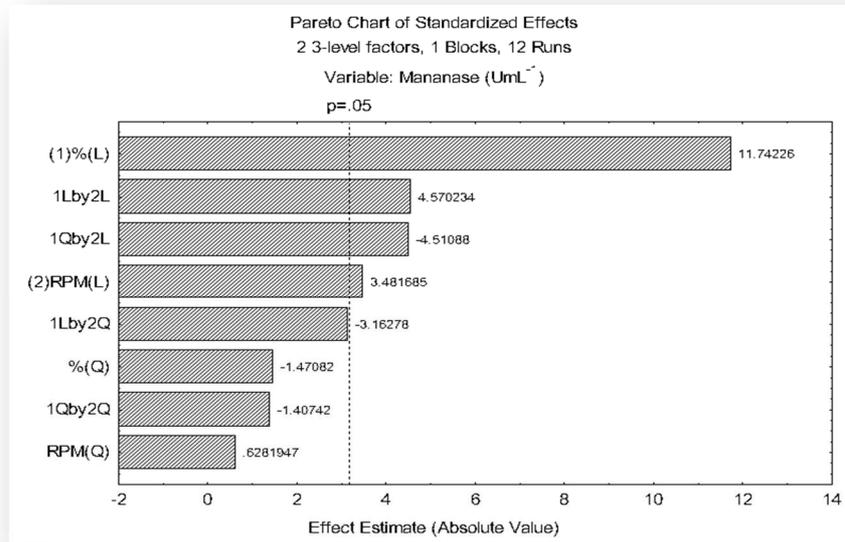


FIGURA 21 - DIAGRAMA DE PARETO PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA AGITAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DE CS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLÉNMEYER

A significância estatística da equação também foi checada pela análise de variância (ANOVA) onde, além da confirmação dos fatores e interações significativos ( $p \leq 0,05$ ), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi de 0,98, o que indica que 98% da variabilidade de resposta foi explicada pelo modelo adotado (TABELA 32).

TABELA 32 - ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DE DIFERENTES TAXAS DE AGITAÇÃO (rpm) E CONCENTRAÇÃO DE CASCAS DE SOJA (% m/v) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM FRASCOS ERLÉNMEYER

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRÁTICAS	RAZÃO f	RAZÃO p
(1) % (L)	1165,942	1	1165,942	137,8808	0,001
%(Q)	18,29328	1	18,29328	2,163309	0,237
(2) RPM (L)	102,5067	1	102,5067	12,12213	0,040
RPM (Q)	3,337042	1	3,337042	0,394629	0,574
1L com 2L	176,6241	1	176,6241	20,88704	0,019
1L com 2Q	84,5883	1	84,5883	10,00316	0,051
1Q com 2L	172,0661	1	172,0661	20,34803	0,020
1Q com 2Q	16,7501	1	16,7501	1,980817	0,254

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra  
p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

### 5.3 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS EM BIORREADORES DE BANCADA

#### 5.3.1 Produção de mananases por FESS em biorreator do tipo Tanque Agitado (STR)

Após as etapas de otimização de condições de produção de mananase por FESS em frascos Erlenmeyer, iniciou-se o estudo em biorreator do tipo tanque agitado ou *Stirred Tank Reactor* (STR).

Inicialmente, percebeu-se que a concentração de CS anteriormente utilizada, 15% (m/v), impediu a agitação necessária para promover adequada homogeneização do meio no biorreator.

A agitação mecânica, realizada por impelidores do tipo pás planas, exigiria demasiado esforço do equipamento e acabaria por acarretar danos ao mesmo. Testes simples de agitação foram então realizados com diferentes concentrações de CS e água, onde ao final, concluiu-se que a concentração máxima permitida deste substrato seria de 2,5% (m/v).

Com a agitação fixa em 180 rpm, limite máximo operacional com sólidos em suspensão, realizou-se o estudo da influência de duas condições de aeração forçada 3 e 6 L.min<sup>-1</sup>.

A cinética de produção de mananase em biorreator com aeração de 3 L.min<sup>-1</sup>, mostrou que o pico de produção da enzima (11,06 U mL<sup>-1</sup>) ocorreu em 96 horas, com produtividade de 0,11 U mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (TABELA 33).

No segundo estudo, o nível de aeração forçada foi elevado a 6 L.min<sup>-1</sup>, e a produção de mananase foi incrementada em 28,87% (15,55 U mL<sup>-1</sup>) e produtividade (0,21 U mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), em menor intervalo de tempo, 72 horas (TABELA 33).

TABELA 33 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS 2,5% (m/v) EM BIORREATOR DO TIPO STR (180 rpm) UTILIZANDO DIFERENTES TAXAS DE AERAÇÃO (3 E 6 L.min<sup>-1</sup>)

TEMPO (h)	FESS STR - AERAÇÃO 3 L.min <sup>-1</sup>		FESS STR - AERAÇÃO 6 L.min <sup>-1</sup>	
	MANANASE (U mL <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE (U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	MANANASE (U mL <sup>-1</sup> )	PRODUTIVIDADE (U mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
24	2,12	0,09	0,73	0,03
48	1,59	0,03	9,90	0,20
72	1,30	0,02	15,55	0,21
96	11,14	0,11	3,01	0,03
120	5,66	0,05	0,00	0,00

A produção da enzima foi muito inferior à máxima alcançada em frascos Erlenmeyer (76,86 U mL<sup>-1</sup>). Provavelmente tal redução ocorreu devido a dois importantes fatores: agitação mecânica e concentração de CS.

Apesar de biorreatores do tipo STR serem comumente empregados na produção industrial de enzimas, a distribuição da tensão de cisalhamento dentro do tanque agitado é de difícil entendimento e modulação, muitas vezes resultando em danos aos microrganismos filamentosos e considerável redução na produção da enzima (AHAMED; VERMETTE, 2010).

Techapun *et al.* (2003), ao estudarem a produção de xilanase por FSm em biorreator STR com *Streptomyces* sp., concluíram que a melhor taxa de agitação foi de 150 rpm, e a melhor aeração foi de apenas 1 vvm. Tais fatores, ao serem elevados à 300 rpm e 2 vvm, individualmente ou em conjunto, influenciaram negativamente a produção da enzima.

O fungo filamentoso *A. niger* pode ser sensível às tensões de cisalhamento geradas pela agitação mecânica, assim como outro fungo, *Trichoderma reesei*, o qual por meio de análises microscópicas teve comprovada a sua sensibilidade à agitação mecânica. Segundo Ahamed e Vermette (2010), tal análise revelou que além de menor produção enzimática (celulases) na presença de agitação mecânica em biorreator do tipo STR, o microrganismo *Trichoderma reesei* também sofreu comprovado cisalhamento, apontado pela diminuição de hifas miceliais e o aumento de extremidades, visualizadas na microscopia.

Além disso, os resultados deste estudo com FESS sugerem que a CS atua não somente como substrato com fatores nutricionais ao microrganismo, mas também como indutora na produção da mananase. Com a redução na concentração da CS de 15 para 2,5% (m/v), constatou-se o declínio na produção da enzima, corroborando com os estudos anteriores realizados em frascos de Erlenmeyer, onde tal fator já havia sido demonstrado como significativo para a produção da enzima.

Entretanto, é importante salientar que, ainda que a quantidade de CS tenha sido reduzida para 2,5% (m/v), o crescimento abundante do fungo filamentoso *A. niger* NRRL 328 foi observado. Contudo, o microrganismo se desenvolveu preferencialmente na região próxima às paredes do biorreator, onde houve acúmulo e aderência da CS desencadeadas pela agitação mecânica, o que acabou por ocasionar uma leve descaracterização do processo semissólido (FIGURA 22).

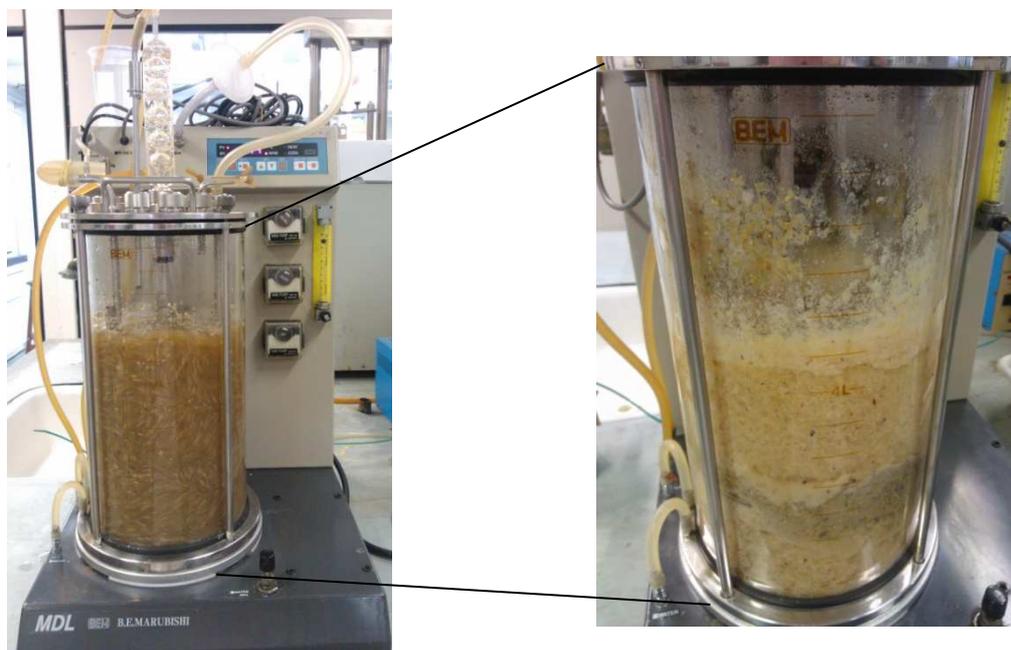


FIGURA 22 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (2,5%, m/v) EM BIORREATOR STR. DESTAQUE PARA O CRESCIMENTO DO FUNGO FILAMENTOSO *A. niger* NRRL 328

### 5.3.2 Produção de mananases por FESS em biorreator do tipo Coluna de Bolhas (BCR)

Fermentadores com diferentes *designs* têm sido sugeridos para aumentar a taxa de transferência de oxigênio, ao mesmo tempo em que limitam os efeitos deletérios da tensão de cisalhamento, como por exemplo, os biorreatores com agitação pneumática do tipo *air lift* ou coluna de bolhas. Na ausência de impelidores, estes biorreatores podem ser operados sem peças e rolamentos em movimento e, portanto, com menor quantidade de seladores e melhor condição asséptica (CHISTI, 1989; AHAMED; VERMETTE, 2010).

Uma vez que a agitação mecânica apresentou influência negativa sobre a produção de mananase por *A. niger* em FESS, o biorreator do tipo BCR, com aeração pneumática, foi testado como alternativa ao biorreator do tipo STR.

A produção média de mananase foi de  $30 \text{ U mL}^{-1}$ , superior à obtida em biorreator do tipo STR (TABELA 34). Neste caso dois fatores podem ter contribuído para o aumento da atividade enzimática: a maior concentração de CS empregada (15%, m/v) e o tipo de aeração (pneumática) utilizada no BCR (FIGURA 23).

Quando comparados à STRs, os biorreatores com agitação pneumática como os do tipo BCR, apresentam menor consumo energético, boa capacidade de homogeneização em meios com sólidos em suspensão, eficiente transferência de massa e calor e padrões de fluxo melhor definidos (PETERSEN; MAGARITIS, 2001; LUO; AL-DAHAN, 2008).

Dentre os três sistemas testados neste trabalho para a produção de mananase pela técnica de FESS (frascos Erlenmeyer e biorreatores dos tipos STR e BCR), fica claro que os estudos devem ser novamente otimizados à medida que as condições físicas de produção são modificadas.

A maior produção de mananase ( $76,86 \text{ U mL}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,64 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) obtida em frascos Erlenmeyer, não se repetiu quando utilizada a mesma composição de meio fermentativo no biorreator do tipo BCR ( $30,02 \text{ U mL}^{-1}$  e  $0,31 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ). Contudo, dentre os biorreatores testados, o emprego do tipo BCR se mostrou mais eficiente para a produção de mananase, quando comparado ao STR (TABELA 34).

TABELA 34 – COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES SISTEMAS PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS E *A. niger* NRRL 328

MANANASE	FRASCOS	BIORREATOR	BIORREATOR
	ERLENMEYER	STR	BCR
	15% CS (m/v)	2,5% CS (m/v)	15% CS (m/v)
$\text{U mL}^{-1}$	76,86	15,55	30,02
$\text{U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$	0,64 (120 h)	0,21 (72 h)	0,31 (96 h)

Ao observar o perfil de agitação e aeração dos dois modelos de biorreatores, foi possível constatar que a vantagem do BCR se dá quanto à homogeneização das partículas sólidas de CS no meio fermentativo, com ocorrência de movimentação uniforme das partículas e dos *pellets* formados pelo fungo, característica típica do processo semissólido.



FIGURA 23 – PRODUÇÃO DE MANANASE POR FESS COM CS (15%, m/v) E *A. niger* NRRL 328 EM BIORREATOR BCR

Contudo, fatores como diferentes temperaturas e taxas de aeração, aliados ao design da coluna, precisam ser explorados. As características da placa porosa do biorreator BCR, responsável pela dispersão do ar e formação das bolhas, precisam ser melhoradas. Diferentes tipos de materiais e diâmetros precisam ser estudados a fim de evitar a formação de caminhos preferenciais, observados em alguns momentos da FESS.

O processo de amostragem também deve ser facilitado. O mesmo é viável para processos de FSm, porém, esta não é a realidade quando se trata de FESS. A presença de partículas sólidas em suspensão e também o crescimento do microrganismo faz com que ocorra o aumento da viscosidade, o que torna a realização de amostragens impraticável em alguns momentos.

Apesar da necessidade de otimização, a FESS - enquanto processo alternativo para a produção de mananase - mostrou-se possível também em maior escala, com o emprego de biorreatores.

#### 5.4 PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm EM FRASCOS ERLLENMEYER

Uma terceira alternativa para a produção de mananase seria a técnica de fermentação submersa (FSm), a qual poderia ser interessante se o objetivo for o escalonamento do processo.

Realizada com extrato aquoso de CS e solução nutritiva composta por uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1 g/L), a média da produção de mananase em FSm atingiu 11,63 U mL<sup>-1</sup>, após 6 dias de cultivo com produtividade de 0,081 U mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. O resultado não foi superior ao obtido em FESS e FES.

Para otimizar o processo produtivo de mananase por FSm, decidiu-se realizar um estudo adicionando sacarose como fonte de carbono suplementar e o indutor LBG. Um delineamento do tipo composto central rotacional (DCCR) foi realizado com diferentes concentrações (g/L) de sacarose e LBG. A maior atividade de mananase (28,33 U mL<sup>-1</sup>) foi obtida quando utilizada sacarose em baixa concentração (4,1 g/L) e LBG em concentração intermediária (2,5 g/L) (TABELA 35).

TABELA 35 - RESPOSTAS E VARIÁVEIS DECODIFICADAS DO DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR) PARA AVALIAÇÃO DA FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E DO INDUTOR (LBG) NA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm

	SAC(g/L)	LBG (g/L)	MAN (U mL <sup>-1</sup> )
1	5,8	1,5	17,03
2	5,8	3,5	13,20
3	14,2	1,5	10,50
4	14,2	3,5	13,54
5	4,1	2,5	28,33
6	15,9	2,5	11,26
7	10	1	12,18
8	10	4	12,43
9	10	2,5	11,82
10	10	2,5	13,44
11	10	2,5	11,75
12	10	2,5	12,41

O LBG é fonte de galactomanana proveniente das vagens de uma árvore (*Ceratonia siliqua*) conhecida como alfarrobeira. Figura entre os mais importantes espessantes e estabilizantes utilizados na indústria alimentícia e se dissolve por completo apenas com elevada temperatura, portanto, é também preferido para

utilização como substrato nos ensaios para determinação da atividade de mananase (DOYLE *et al.*, 2006).

Apesar do incremento na atividade da enzima, o resultado ainda é inferior ao obtido com a FESS realizada em frascos Erlenmeyer: 76,86 U mL<sup>-1</sup>, apenas com sacarose, sem necessidade da adição de LBG, o que acabaria elevando o custo do processo produtivo.

Em situação semelhante, utilizando a técnica de FSm em frascos de Erlenmeyer com *A. niger* e copra desengordurada acrescida de solução nutritiva, Lin e Chen (2004) também produziram 28 U mL<sup>-1</sup> de mananase. A copra, no caso, foi escolhida pelos pesquisadores, por razões bastante similares à nossa escolha pela CS. Em Taiwan, a polpa seca do côco, conhecida como copra, é descartada após o consumo da água, e portanto considerada um resíduo, porém, rico em manana.

De acordo com a FIGURA 24, a produção de mananase por FSm poderia ser elevada adicionando ao extrato aquoso de CS, além de uréia (0,7 g/L) e sulfato de manganês (1g/L), sacarose em torno de 2 g/L e LBG na faixa de 1 – 1,5 g/L.

Esse resultado indica que o extrato aquoso de CS é uma excelente alternativa para a produção de mananase por FSm, uma vez que requer a adição de baixa concentração de solução nutritiva, pois o mesmo é capaz de fornecer os nutrientes necessários.

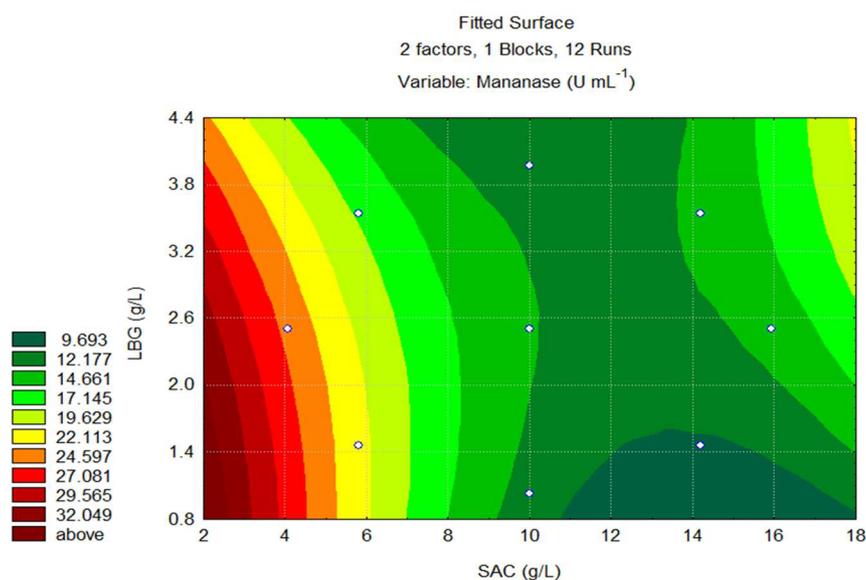


FIGURA 24 – GRÁFICO DE CONTOURNO PARA O ESTUDO DE OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E INDUTOR (LBG) PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm

A análise de variância (ANOVA) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,78, o que indica que 78% da variabilidade de resposta pode ser explicada pelo modelo adotado.

De acordo com a TABELA 36, a ANOVA determina que a sacarose foi o único fator significativo ( $p \leq 0,05$ ), corroborando com a otimização anterior realizada para FES (WEINGARTNER, 2010), a qual também não apresentou significância para LBG.

TABELA 36 - ANOVA DA OTIMIZAÇÃO DA FONTE DE CARBONO (SACAROSE) E INDUTOR (LBG) PARA PRODUÇÃO DE MANANASE POR FSm

FATOR	SOMA DOS QUADRADOS	GRAUS DE LIBERDADE	MÉDIAS QUADRÁTICAS	RAZÃO f	RAZÃO p
(1) SAC (L)	114,9934	1	114,9934	12,6367	0,012
SAC (Q)	61,4792	1	61,4792	6,755994	0,041
(2) LBG (L)	0,023811	1	0,023811	0,002617	0,961
LBG (Q)	2,667723	1	2,667723	0,293158	0,608
1Lby 2L	11,79923	1	11,79923	1,296625	0,298

Onde: f = razão entre a variabilidade das amostras e a variabilidade dentro da amostra  
p = nível de significância no intervalo de probabilidade escolhido (5%)

## 5.5 PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE

Além de explorar as técnicas de FES, FSm e, principalmente, FESS para a produção de mananase por via convencional, buscou-se também elevar seu rendimento a níveis que despertassem interesse por sua produção em escala industrial. Este foi o ponto de partida para a realização dos experimentos que abrangeram a produção de mananase pela via recombinante.

Tal via envolve diversos procedimentos no âmbito biologia molecular e é empregada com sucesso na obtenção de enzimas industriais, diminuindo custos e elevando rendimentos, o que torna a utilização da via convencional, uma estratégia cada vez mais incomum.

### 5.5.1 Estudo comparativo da produção de mananase pela cepa parental *A. niger* NRRL 328 com a técnica de FSm em frascos Erlenmeyer

Os estudos de produção da mananase recombinante iniciaram pelos ensaios com a cepa parental. A produção de mananase por *A. niger* NRRL 328 foi realizada por FSm em frascos de Erlenmeyer com meio de cultivo sintético (FIGURA 25), afim de possibilitar a futura comparação com a produção da enzima recombinante por FSm, expressa de forma heteróloga pela levedura *P. pastoris* em frascos de Erlenmeyer com meio sintético.



FIGURA 25 - FUNGO *A. niger* NRRL 328 CULTIVADO EM MEIO SINTÉTICO POR FSm PARA PRODUÇÃO DE MANANASE

De acordo com a FIGURA 26, o pico de produção de mananase ( $1,03 \text{ U mL}^{-1}$ ) ocorreu em 96 horas, com a adição de 5 g/L de LBG (indutor). A produtividade neste caso foi de  $0,011 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

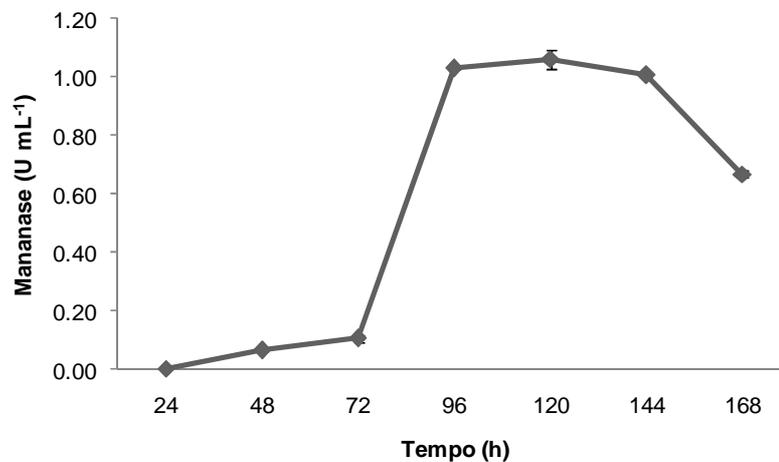


FIGURA 26 – ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE MANANASE POR *A. niger* NRRL 28 (CEPA PARENTAL) EM FSm COM MEIO SINTÉTICO EM FRASCOS ERLLENMEYER

### 5.5.2 Extração e purificação do RNA de *A. niger* NRRL 328

O micélio do fungo filamentoso *A. niger* NRRL 328 foi devidamente tratado (com solução DEPC 0,1% para evitar a contaminação por RNases) e após o processo de liofilização rendeu 90 mg. De acordo com o kit utilizado para a extração e purificação do RNA (QIAGEN, 2012), a quantidade máxima de micélio indicada para o procedimento é de 100 mg, portanto, toda a biomassa fúngica, tratada e liofilizada, foi macerada na presença de nitrogênio líquido para extração do RNA. O RNA purificado (RNA mensageiro) foi quantificado (260 nm) em 1019 ng/ $\mu$ L, totalizando 40  $\mu$ g, quantidade mais que suficiente para ser utilizada como molde na obtenção do cDNA pela técnica de PCR, segundo o kit utilizado (QIAGEN, 2011).

Os estudos moleculares de genes relacionados à atividade de metabólitos secundários exigem a extração RNA de boa qualidade a partir de biomassa fúngica. No entanto, a parede celular de fungos filamentosos é composta por quitina, (1-3)- $\beta$ -D-glucano, (1-6)- $\beta$ -glucano, lipídeos e peptídeos que podem influenciar nas etapas dos estudos genéticos destes organismos (FRANCESCONI *et al.*, 2008).

A estrutura da parede celular fúngica, aliada à atividade endógena de RNases, tornam difícil seu rompimento para a extração do ácido nucléico. Por esta razão, a utilização de métodos padronizados para extração de RNA desenvolvida para células animais, bactérias ou leveduras não pode ser facilmente aplicada no caso de fungos filamentosos (LEITE; MAGAN; MEDINA, 2012). Assim, a adequada extração e purificação do RNA fúngico é um passo crítico para garantir o sucesso da aplicação das técnicas moleculares subseqüentes, tais como ensaios de PCR para obtenção de cDNA.

As técnicas mais comuns para a extração de ácidos nucléicos fúngicos são a utilização de enzimas que degradam a parede celular (WILLIAMSON *et al.*, 2000) e a moagem física realizada com gelo seco ou nitrogênio líquido (AL-SAMARRAI; SCHMID, 2000; GRIFFIN *et al.*, 2002), a qual foi aplicada com sucesso neste trabalho.

### 5.5.3 PCR para amplificação do cDNA

Na FIGURA 27, é possível visualizar gel de agarose obtido após corrida eletroforética, o qual confirmou o sucesso da amplificação realizada por PCR.

O produto da amplificação (cDNA), também conhecido como amplicon, apresentou massa molecular esperada de 1035 pb (FIGURA 27), correspondente ao tamanho do fragmento desejado relativo à sequência codificadora da mananase em *A. niger* BK 01 (GenBank FJ268574.1).

A PCR foi realizada com três diferentes temperaturas de anelamento (58, 60 e 62 °C) e o resultado foi o mesmo para todas as temperaturas. A presença de apenas uma banda nas amostras analisadas indica a ausência de ampliações inespecíficas (FIGURA 27).

A ausência de bandas nas amostras nomeadas “Controle Negativo” indicou que não houve contaminações por DNA/RNA indesejados, confirmando o sucesso do procedimento realizado.

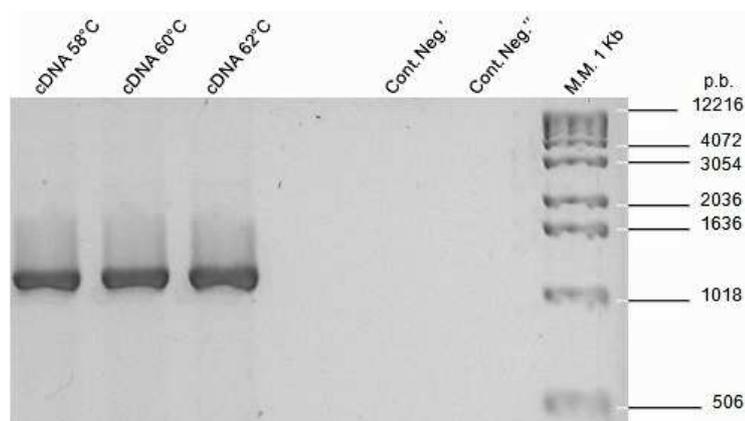


FIGURA 27 – PRODUTOS DA PCR EM GEL DE AGAROSE 1,5%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™)

### 5.5.4 Digestão enzimática do vetor e do amplicon pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I*

O fragmento amplificado contém, em ambas as porções terminais, regiões codificadoras para as enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I*, as quais permitem sua inserção no vetor escolhido (plasmídeo pPICZα A).

O vetor (plasmídeo pPICZ $\alpha$  A) e o amplicon (AmpMAN) escolhido para dar continuidade ao trabalho (temperatura de anelamento em 62 °C), foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I*, e então purificados.

Em amostras de plasmídeos não digeridos é possível observar a presença de 4 bandas, correspondentes à dobramentos de DNA. Quando há digestão do plasmídeo, há também a migração do DNA linear e a presença de apenas uma banda é esperada no gel (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

A eficácia da digestão enzimática, para o plasmídeo e para o amplicon, foi confirmada pela eletroforese em gel de agarose, onde é possível observar cada etapa da digestão (FIGURA 28).

O plasmídeo não digerido, apresentou 4 bandas, sendo as duas últimas tão próximas que é possível visualizar no gel apenas uma com elevada espessura.

De acordo com Sambrook e Russel (2001), além do tamanho, a conformação do DNA, também afeta a migração na eletroforese, o que justificaria o comportamento do plasmídeo não digerido, uma vez que amostras de DNA circular tentem a migrar de forma diferenciada quando comparadas ao DNA linear.

Já as amostras de DNA plasmidial, digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I*, geraram apenas uma banda em cada etapa da digestão, com tamanho aproximado de 3054 pb. O amplicon digerido também gerou apenas uma banda, localizada próxima à 1018 pb (FIGURA 28).

Não foi observada diferença significativa entre as bandas do plasmídeo ou amplicon digeridos apenas por *EcoRI* ou por *EcoRI* e *Xba I* (FIGURA 28). Contudo, de acordo com Scheuer (2014), a digestão com as enzimas de restrição elimina apenas alguns poucos nucleotídeos, portanto, não é esperada diferença significativa entre as bandas no gel de eletroforese, mas sim a presença de apenas uma banda, a qual confirma a eficácia da digestão pelas enzimas de restrição utilizadas.

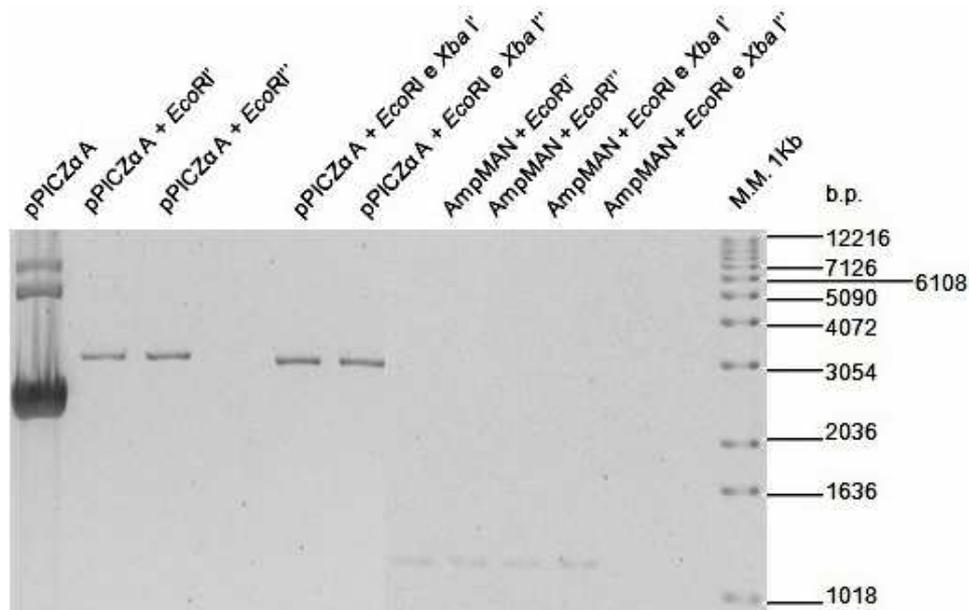


FIGURA 28 – PRODUTOS DA DIGESTÃO COM AS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *EcoRI* E *Xba I*. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™)

### 5.5.5 Transformação de *E.coli* DH5α por choque térmico e seleção dos clones recombinantes

O amplicon e o vetor digeridos foram unidos pela ação da enzima T4 DNA Ligase. O inserto formado foi então utilizado para transformar a bactéria *E. coli* DH5α pela técnica de choque térmico. A *E. coli* DH5α também foi transformada apenas com o plasmídeo pPICZα A (vazio, sem o amplicon), como forma de controlar o processo de transformação.

No meio de cultura seletivo LB suplementado com zeocina (antibiótico pelo qual o vetor possui resistência), foi observado o crescimento de várias colônias transformadas. Para a seleção dos clones de *E. coli* DH5α transformados, foram analisadas três colônias transformadas com o plasmídeo pPICZα A sem o amplicon (Controle Negativo 1, 2 e 3) e três colônias transformadas com o amplicon (Colônias 1, 2 e 3).

Conforme é possível visualizar no gel de agarose (FIGURA 29), todas as três colônias de *E. coli* DH5α referentes ao controle negativo apresentaram uma banda inferior entre 2036 e 3054 pb. Contudo, as três colônias de *E. coli* DH5α transformadas com o inserto apresentaram uma banda superior entre 3054 e 4072 pb, o que indica a ocorrência de integração do inserto pela bactéria. Uma das

amostras referente à duplicata da colônia 3 não apresentou nenhuma banda no gel de agarose, provavelmente devido à um erro durante a manipulação para extração do DNA.

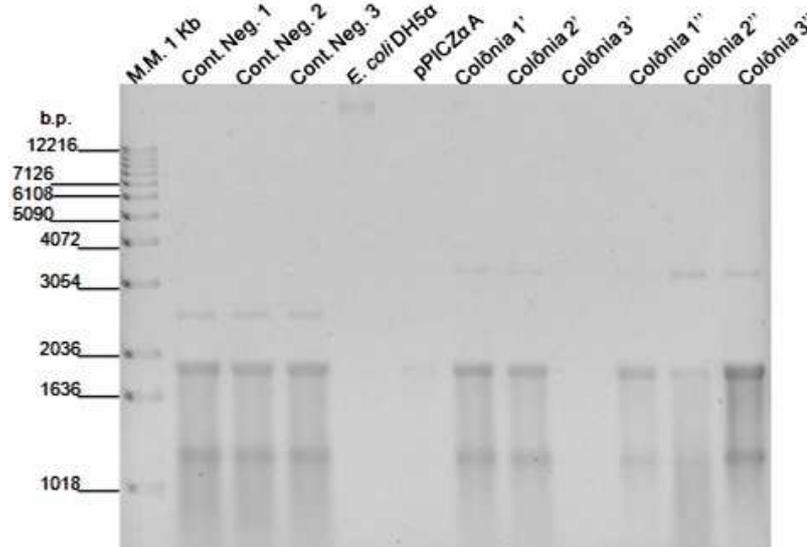


FIGURA 29 – DNA EXTRAÍDO DAS COLÔNIAS DE *E. coli* DH5 $\alpha$  TRANSFORMADAS COM OS PLASMÍDEOS VAZIO E RECOMBINANTE. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™)

Conforme discorrem Çelik e Çalik (2012), um marcador seletivo se faz necessário, não apenas para selecionar os transformantes, mas também para assegurar a “sobrevivência” dos plasmídeos através das gerações.

Marcadores de seleção dominante incluem genes que conferem algum tipo de resistência, como por exemplo, resistência ao cobre (FOGEL; WELCH, 1982) ou a antibióticos como cloranfenicol (JIMENEZ; DAVIES, 1980), higromicina (GRITZ; DAVIES, 1983) e zeocina (PFEIFER *et al.*, 1997), entre outros.

O uso de antibióticos pode ser caro, indesejado (no caso de produtos alimentares e terapêuticos), ou mesmo ineficaz (em determinadas situações o antibiótico pode ser degradado ou inativado). No entanto, ele não necessita de uma linhagem hospedeira engenheirada e pode ser usado para seleção em meios de cultivo ricos (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

As colônias 1, 2 e 3 foram selecionadas para a extração e purificação de seus plasmídeos recombinantes, os quais também foram duplamente digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *Xba I*, afim de confirmar a presença do inserto.

A digestão dupla se mostrou eficaz para os plasmídeos de todas as colônias analisadas (1, 2 e 3). O gel (FIGURA 30) apresentou duas bandas para cada

plasmídeo recombinante duplamente digerido (PR1 dig., PR2 dig. e PR3 dig., analisados em duplicata). A banda com massa molecular 3054 e 4072 pb, correspondeu à digestão do DNA plasmidial (aproximadamente 3600 pb), enquanto que a banda entre 1018 e 1636 pb, correspondeu à digestão do amplicon (aproximadamente 1035 pb) (FIGURA 30).

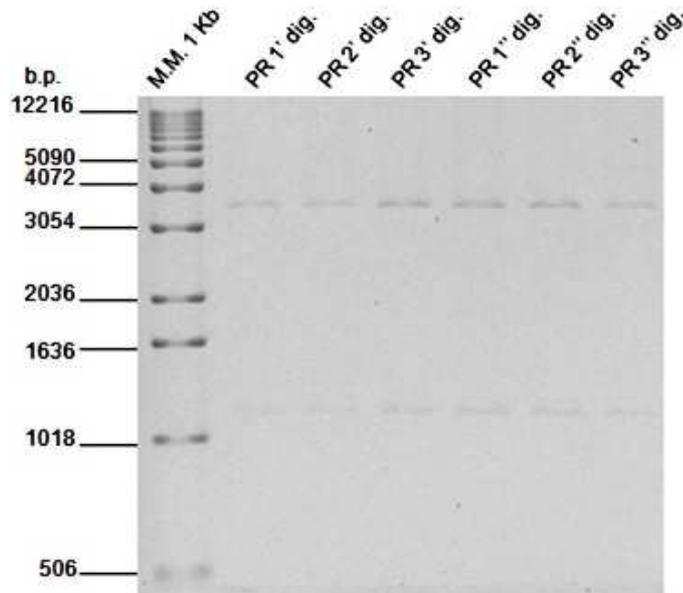


FIGURA 30 – PLASMÍDEOS RECOMBINANTES DUPLAMENTE DIGERIDOS PELAS ENZIMAS DE RESTRIÇÃO *EcoRI* E *Xba I*. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR 1 Kb DNA LADDER (INVITROGEN™)

#### 5.5.6 Sequenciamento dos plasmídeos recombinantes

Foram sequenciados o plasmídeo vazio (sem o inserto, como forma de controle negativo) e o plasmídeo recombinante da colônia 3, para verificar seu correto posicionamento do inserto. O resultado do sequenciamento confirmou o sucesso da transformação em *E. coli* DH5 $\alpha$ .

As sequências de DNA obtidas (FIGURAS 31 e 32) e submetidas ao *software online* Blast-n do NCBI para identificação por similaridade, foram correlacionadas ao RNAm de *mannan endo-1,4-beta-mannosidase F*, pertencente ao fungo filamentoso *Aspergillus niger* CBS 513.88 (GenBank: XM\_001390670.1). O sequenciamento mostrou que o inserto no plasmídeo compreende as bases de 115 a 1149, da região codificante do RNAm. Este resultado possui considerável importância, pois indica que o plasmídeo recombinante foi obtido com êxito.

```

CGGGGGTGT TTTGGGTGGCTATCTCTCGAGAAGAGAGGCTGAGCTGAATTCTCCTTCGCCA
GCACCTCCGGCCTCCAATTCAcCATtGAtGGcGAAACTGGCTACTTCGCCGGAACGAACA
GCTACTGGAiCGGTTTCCTCACTGACAACGCGGACGTGACCTCGTCATGGGCCACCTGA
AGTCGTCCGGCCTCAAGATCCTCCGCGTGTGGGGCTTCAACGATGTCACCTCGCAGCCCT
CCTCCGGCACAGTCTGGTACCAACTGCACCAGGACGGCAAATCGACAATCAACACGGGTG
CCGACGGTCTCCAGCGCCTCGACTACGTCTGCTCTGCCGAACAGCACGACATCAAAC
TCATCATCAACTTCGTCAACTACTGGACCGATTACGGTGGTATGTCTGCGTACGTGAGCG
CGTATGGCGGATCCGGCGAGACGGATTTCTATACCAGTGATACCATGCAGAGTGCCTATC
AGACATATATCAAGACGGTCTGGAGCGGTACAGTAACTCCTCGGCGGTGTTTGCCTGGG
AGTTGGCGAATGAGCCGAGATGTCCGAGTTGCGATACTTCTGTGTTGTATAACTGGATTG
AGAAGACGAGTAAGTTTTATTAAGGGGTTGGATGCGGATCGTATGGTTTTATTGGTGATG
GTGAGTTGCCCCATACTCAGTCCTTGATTTTTAGTTTTGTATGGTGGGTGCTGATGAAAG
GTAGAGGGCTTCGGTCTTCAACATCGACTCGGACGGCAA

```

FIGURA 31 – SEQUÊNCIA EXPORTADA DA AMOSTRA 34308.ab1 (INSERTO DA COLÔNIA 3) ESTENDIDA COM O *PRIMER FORWARD* E ALINHADA COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA XM\_001390670.1. EM **NEGRITO E SUBLINHADO**, A SEQUÊNCIA RECONHECIDA PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Eco RI*

```

TATACTCGTGAGAGAGCCCGACGTATATATGGTCCGGATTTCCCGCGAGGACCGGATTTT
CCTATTACCCAGTGATTACCCATGCAGAAGTGCCTATCAGACATATATCAAGACCGGTTCC
GTGGAAGCGGGTACAGTAACTCCCTCGCGGTGTTTGCCTGGGAGTTGGCGAAATGAGCCG
AGATGTCCGAGTTGCGATACTTCTGTGTTGTATAACTGGATTGAGAAGACGAGTAAGTT
TTATTAAGGGGTTGGATGCGGATCGTATGGTTTTGTATTGGTGATGGTGAGTTGCCCCAT
ACTCAGTCCTTGATTTAGTTTTGTATGGTGGGTGCTGATGAAAGGTAGAGGGCTTCGGT
CTCAACATCGACTCGGACGGCAGCTACCTTATCAATTCTCCGAGGGCTTGAACCTTACG
ATGAACCTCGGTATCGATACTATTGACTTTGGTACCCTCCACTTGTACCCTGATAGCTGT
ACGTACCCCTCTCCCCCTTACTCTCCTTGCCGTCAATATCCAGACTAATCAAATGAAGGG
GGCACCTCCGACGACTGGGGCAACGGCTGGATCACCGCCCACGGCGCAGCCTGCAAAGCG
GCCGGCAAGCCATGTCTCCTGGAGGAATACGGAGTCACCTCGAACCCTGCAGTGTGGAG
GGCTCGTGGCAGAAGACAGCGCTCAGCACAACGGGCGTCCGGCGCGGATCTGTTCTGGCAG
TATGGTGATGATTTGAGTACCGGGAAGTCGCCGGATGATGGGAATACTATCTACTATGGG
ACTAGTGATTATCAGTGCCCTGGTGACGGATCATGTTGCTGCTATTGGTAGTGCTCTAGAA
CAAAAACATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCCTCTT
TTATTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACC
GGTCTGCTAGTTTACCTTTTTCCCA

```

FIGURA 32 – SEQUÊNCIA EXPORTADA DA AMOSTRA 34307.ab1 (INSERTO DA COLÔNIA 3) ESTENDIDA COM O *PRIMER REVERSE* E ALINHADA COM A SEQUÊNCIA DE REFERÊNCIA XM\_001390670.1. EM **NEGRITO E SUBLINHADO**, A SEQUÊNCIA RECONHECIDA PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *XbaI*

### 5.5.7 Linearização com *Sac I*

Baseado nas recomendações do manual Invitrogen™ para o plasmídeo pPICZα A (LIFE TECHNOLOGIES, 2010) e para a expressão em *Pichia pastoris* (LIFE TECHNOLOGIES, 2014) os plasmídeos (vazio e recombinante) foram linearizados em etapa prévia à transformação da levedura.

A enzima de restrição *Sac* I foi utilizada nesta digestão e o resultado foi elucidado por eletroforese em gel de agarose 1% (FIGURA 33).

A bem sucedida etapa de linearização foi confirmada, uma vez que os plasmídeos linearizados apresentaram uma banda mais intensa localizada entre 2027 e 4361 pb, porém, com notável diferença entre as amostras circulares e linearizadas. Além disso, o plasmídeo recombinante linearizado apresentou banda de maior peso molecular do que o plasmídeo vazio linearizado. Tal comportamento era esperado, uma vez que o plasmídeo recombinante possui o amplicon, o qual acrescenta ao mesmo aproximadamente 1035 pb (FIGURA 33).

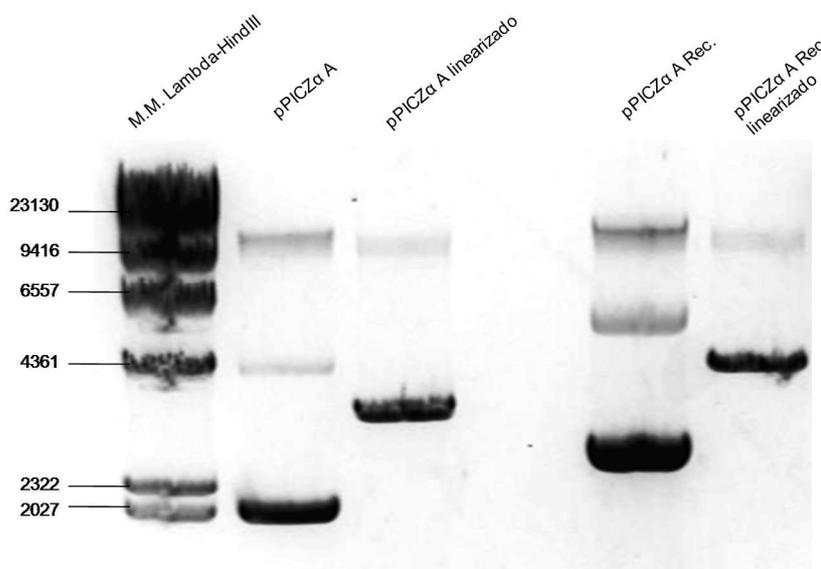


FIGURA 33 – PLASMÍDEOS pPICZ $\alpha$  A (VAZIO E RECOMBINANTE) CIRCULARES OU LINEARIZADOS PELA ENZIMA DE RESTRIÇÃO *Sac* I. GEL DE AGAROSE 1%, TAMPÃO TBE 1X E MARCADOR MOLECULAR LAMBA-HIND III (THERMO SCIENTIFIC)

#### 5.5.8 Transformação de *P. pastoris* GS115 por eletroporação

Após linearização, os plasmídeos foram purificados. O DNA (massa total) foi quantificado em 6,81  $\mu$ g para o plasmídeo vazio e 9,92  $\mu$ g para o plasmídeo recombinante, quantidade esta suficiente para realizar a transformação da *P. pastoris* por eletroporação (LIFE TECHNOLOGIES, 2010).

As células competentes da *P. pastoris* GS115 e os plasmídeos linearizados foram eletroporados e cultivados em placas de Petri com ágar YPDS suplementado

com 1000 µg/mL zeocina. Como controle negativo para a levedura e meio de cultura, a mesma foi cultivada em ágar YPDS/zeocina sem passar por transformação.

Como era esperado, não houve crescimento de nenhuma colônia devido à presença do antibiótico zeocina no meio, e ausência do plasmídeo pPICZα A na *P. pastoris* GS115 (FIGURA 34, A). Após 3 dias de incubação das placas, foi possível visualizar o crescimento das várias colônias de *P. pastoris* GS115 transformadas por eletroporação (FIGURA 34, B e C). Foi possível observar igualmente o maior número de colônias de *P. pastoris* GS115 transformada com o plasmídeo recombinante (FIGURA 34, C), quando comparada à transformação realizada com o plasmídeo vazio (FIGURA 34, B).

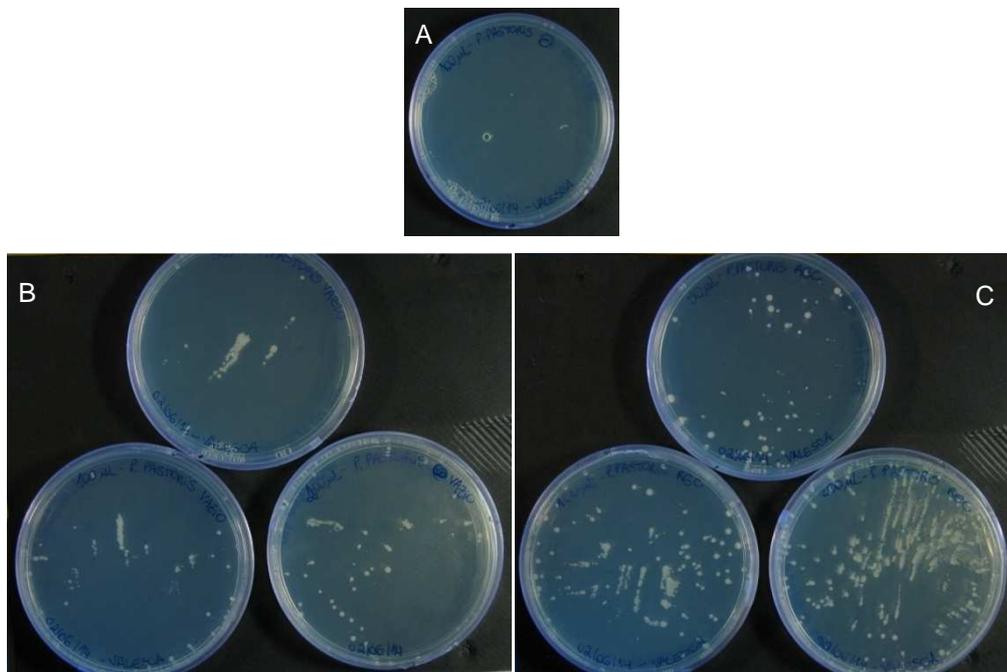


FIGURA 34 – A) CONTROLE NEGATIVO DO MEIO DE CULTURA E LEVEDURA (*P. pastoris* GS115 CULTIVADA EM YPDS/ZEOCINA 100 µg/mL); B) *P. pastoris* GS115 TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO VAZIO; C) *P. pastoris* GS115 TRANSFORMADA COM O PLASMÍDEO RECOMBINANTE

A transformação, ou seja, a introdução do vetor de expressão nas células de leveduras pode ser mediada por eletroporação, tratamentos com acetato ou cloreto de lítio, e remoção da parede celular (preparação de esferoplastos). A eletroporação, por sua facilidade e o tratamento com acetato de lítio, por sua eficiência de custos, são os métodos preferidos atualmente (ÇELIK; ÇALIK, 2012).

A eletroporação designa o uso de pulsos curtos (micro a milisegundos) de alta voltagem, que ultrapassam a barreira da membrana celular e promovem o

temporário rearranjo estrutural desta membrana, tornando-a altamente permeável a moléculas exógenas por meio de canais aquosos (aquaporinas), capazes de potencializar o transporte iônico e molecular através da membrana (CHANG *et al.*, 1992; GEHL, 2003; IORIO; DI STASSI; BORGES, 2007).

## 5.6 PRODUÇÃO DE MANANASE POR VIA RECOMBINANTE: ESTUDOS DE EXPRESSÃO HETERÓLOGA

Vários sistemas de expressão de proteínas heterólogas têm sido explorados. As proteínas expressas em *E. coli*, além de não possuírem promotor eucariótico para modificações pós-traducionais, também são frequentemente insolúveis e aprisionadas à corpos de inclusão, e assim, estas proteínas podem ser biologicamente inativas (CHEN *et al.*, 2007).

A levedura metilotrófica *P. pastoris* tem demonstrado grande potencial para expressar enzimas industriais importantes, devido ao baixo custo de fermentação requerido e também à sua alta capacidade de secreção (ZHU *et al.*, 2011)

Por todas as características já mencionadas, a levedura *P. pastoris* GS 115 foi escolhida como o microrganismo hospedeiro para a expressão heteróloga de mananase recombinante no presente trabalho.

### 5.6.1 Seleção dos clones recombinantes de *P. pastoris* para expressão de mananase extracelular

Na primeira tentativa de seleção dos clones recombinantes, 44 colônias foram avaliadas (em duplicata) por cultivo em caldo BMMY com indução por metanol 2% (v/v).

Ao final de 96 horas, de acordo com a FIGURA 35, não foi detectada nenhuma atividade de mananase em 7 colônias (6, 13, 26, 27, 30, 38 e 40).

Ao todo, 9 colônias (7, 9, 11, 17, 21, 24, 25, 29, 33 e 34) foram responsáveis pela melhor expressão heteróloga da mananase recombinante. A atividade média ficou na faixa de 1,25 – 1,55 U mL<sup>-1</sup> (FIGURA 35).

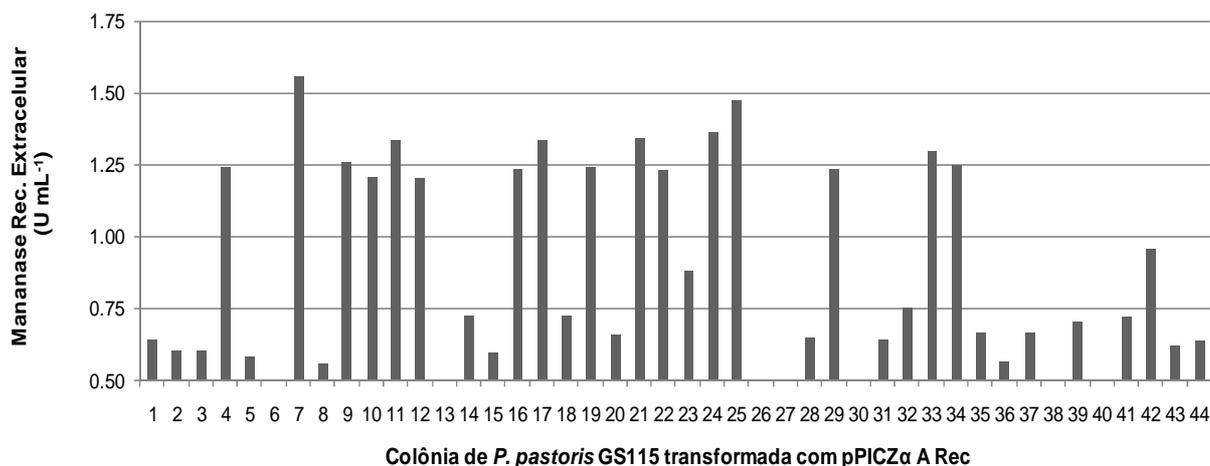


FIGURA 35 – SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES DE *P. pastoris* GS115 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE

As colônias 7, 9, 24, 25, 33 e 34, apesar de apresentarem atividade média de mananase recombinante dentro da melhor faixa obtida, quando analisadas individualmente possuem valores muito distantes entre si (1,19 e 1,77 U mL<sup>-1</sup> para a colônia 25, por exemplo). Com tanta variação e a fim de evitar conclusões duvidosas, estas colônias foram excluídas do estudo seguinte (análise intracelular). Portanto, apenas as colônias 11, 17, 21 e 29, com expressão extracelular média de mananase recombinante em 1,34, 1,33, 1,34 e 1,24 U mL<sup>-1</sup> respectivamente, tiveram seu conteúdo intracelular analisado.

Apesar do índice de mananase recombinante ter sido bastante inferior à outros relatos da literatura para *P. pastoris*: 32,2 U mL<sup>-1</sup> (HE *et al.*, 2008); 669 U mL<sup>-1</sup> (BIEN-CUONG *et al.*, 2009); 161 U mL<sup>-1</sup> (CAI *et al.*, 2011); 29 U mL<sup>-1</sup> (LI *et al.*, 2012); 5069 U mL<sup>-1</sup> (ZHAO *et al.*, 2011); 50,030 U mL<sup>-1</sup> (KATROLIA *et al.*, 2012), quando comparado à cepa parental (*A. niger* NRRL 328) em condições semelhantes de fermentação (1,03 U mL<sup>-1</sup>), a atividade mananolítica foi incrementada em cerca de 50% e portanto, decidiu-se prosseguir os estudos com a levedura.

### 5.6.2 Seleção dos clones recombinantes de *P. pastoris* para expressão de mananase intracelular

Segundo as instruções do manual Invitrogen™ (LIFE TECHNOLOGIES, 2010), ainda que o plasmídeo pPICZ $\alpha$  A possua o fator  $\alpha$ , que codifica a secreção extracelular da proteína recombinante, o teor intracelular também precisa ser analisado.

De acordo com a FIGURA 36, todas as colônias que tiveram seu teor intracelular analisados (11, 17, 21 e 29), apresentaram teor de atividade mananolítica semelhante ao obtido extracelularmente.

Contudo, as colônias 17 e 29 tiveram a melhor expressão heteróloga intracelular da mananase recombinante (1,83 e 1,72 U mL<sup>-1</sup>) e foram selecionadas para a etapa seguinte.

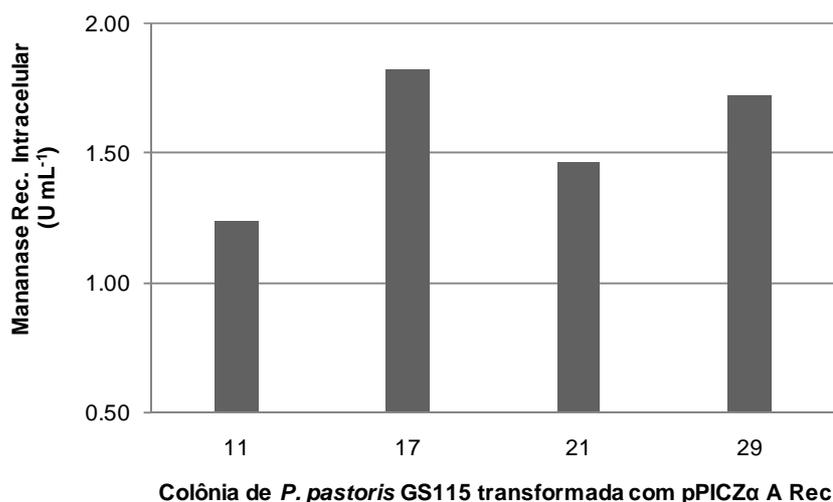


FIGURA 36 – SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES DE *P. pastoris* GS115 PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE

O resultado do conteúdo intracelular, somado ao baixo rendimento extracelular, levantou suspeitas quanto à correta interpretação da levedura para a produção da mananase. Entretanto, decidiu-se seguir com os estudos que abrangeram a otimização da expressão heteróloga de mananase, na tentativa de elevar o índice de expressão.

## 5.7 OTIMIZAÇÃO DA EXPRESSÃO HETERÓLOGA DE MANANASE

### 5.7.1 Seleção de meio de cultura e estudo cinético de expressão heteróloga de mananase

Diferentes meios fermentativos, caldos MMY (sem tamponamento), BMMY (tamponado, pH 6,0) e BMMY (tamponado, pH 6,0 e suplementado com LBG 0,5%) foram testados na tentativa de incrementar a expressão da mananase recombinante pela *P. pastoris*.

Na etapa de cultivo do pré-inóculo em caldo BMGY, as colônias pré-selecionadas 17 e 29, apresentaram comportamentos distintos. À olho nu foi possível detectar menor turbidez, indicando inferior crescimento celular da colônia 29, em comparação à colônia 17. A confirmação de que a colônia 29 não havia atingido no tempo previsto a densidade de células necessária para utilização como inóculo ( $D.O_{600} = 2,0$ ), se deu por análise em espectrofotômetro. A colônia 29 foi então excluída dos experimentos seguintes, os quais prosseguiram apenas com a colônia 17.

No estudo cinético da colônia 17, de um modo geral, o caldo BMMY tamponado em pH 6.0 foi mais eficaz do que o mesmo caldo sem tamponamento (MMY) e do que o mesmo caldo tamponado e suplementado com LBG 0,5%. A expressão da enzima que teve seu pico de produção ( $1,50 \text{ U mL}^{-1}$ ) em 30 horas com o caldo BMMY (FIGURA 37). Após este período a rotação estabelecida até então de 220 rpm, foi reduzida para 120 rpm por razões operacionais limitantes do agitador orbital de bancada (*shaker*).

O caldo BMMY foi bastante semelhante ao caldo BMMY/LBG 0,5% em todas as amostragens realizadas e apesar de ambos terem apresentado a melhor produtividade ( $0,12 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) no mesmo intervalo de tempo ( $1,38$  e  $1,42 \text{ U mL}^{-1}$  em 12 horas), a seleção do caldo BMMY se justifica devido à desnecessária suplementação com LBG, o que torna o meio de cultivo mais viável em termos de custos (FIGURA 37).

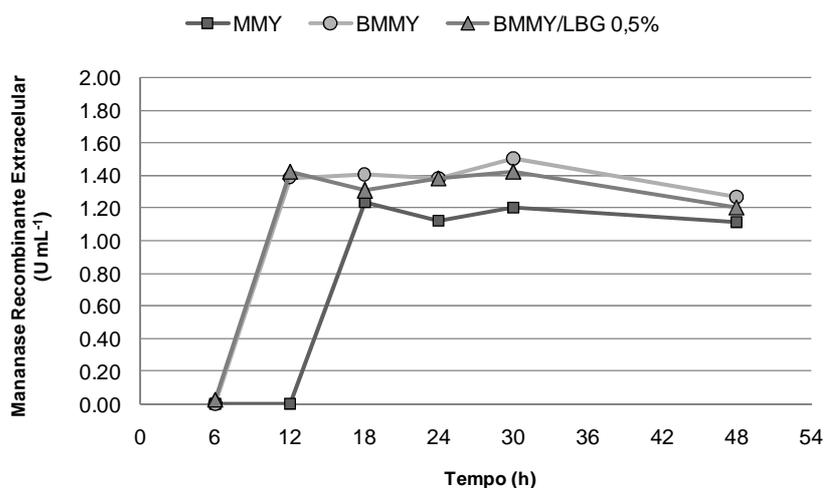


FIGURA 37 – CINÉTICA DE PRODUÇÃO DA MANANASE RECOMBINANTE COM TRÊS DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR POR *P. pastoris* GS115

Segundo Li *et al.* (2007), leveduras como a *P. pastoris* crescem numa faixa de pH que vai de 3,3 à 7. Esta característica é muito importante, pois permite o ajuste do pH do meio, com o objetivo de minimizar a degradação das proteínas secretadas ou de adequá-las à sua condição ótima.

A justificativa para o tamponamento em pH 6 do caldo BMMY se deu baseada nas informações relatadas para a levedura hospedeira e também para a cepa parental. É sabido que a mananase de *A. niger* NRRL 328 possui atividade ótima e melhor produção quando submetida à pHs na faixa de 3,5 - 6, seja o pH do meio fermentativo, ou do ensaio enzimático para determinação da atividade (WEINGARTNER, 2010).

A queda da atividade de mananase observada em 48 horas pode estar relacionada à significativa redução da rotação (100 rpm), uma vez que a levedura é altamente dependente de elevada oxigenação (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

Dalbøge e Heldt-Hansen (1994) ao estudarem um sistema de expressão baseado em *S. cerevisiae* (hospedeiro) e *E. coli* (vetor de transporte episomal), observaram que a atividade obtida na seleção em placas de Petri se limitava a uma quantidade ínfima quando os clones eram propagados em meio líquido. Já Setati *et al.*, (2001), relataram que a otimização das condições do processo fermentativo, bem como das estratégias de recuperação, promoveram melhor secreção e

expressão de mananase recombinante em *S. cerevisiae*. e, nesse contexto, os estudos de otimização foram continuados.

#### 5.7.2 Co-indução com sorbitol e estudo cinético da expressão heteróloga de mananase sob diferentes temperaturas (20 e 30 °C)

A redução da temperatura de incubação, bem como a co-indução por sorbitol são estratégias comumente utilizada em processos fermentativos com *P. pastoris* (ZHU *et al.*, 2011). A secreção de proteínas recombinantes pode ser melhorada por meio da redução da taxa de síntese proteica, de modo a ajustar a sua taxa de secreção pelo ajuste da temperatura (GASSER *et al.*, 2008). O sorbitol pode melhorar a performance da levedura atuando como fonte de carbono e energética não repressoras (INAN; MEAGHER, 2001; RAMON; FERRER; VALERO, 2007; CELIK; ÇALIK; OLIVER, 2009).

Assim, a diminuição da temperatura e a co-indução por sorbitol em caldo BMMY suplementado com metanol, foram testadas com o objetivo de aumentar os níveis de mananase recombinante secretados pela *P. pastoris*.

##### 5.7.2.1 Análise extracelular

A colônia 17 de *P. pastoris* recombinante foi testada no caldo BMMY, suplementado com três diferentes concentrações de sorbitol (1, 3 e 5%, m/v). O cultivo ocorreu por 96 horas, em duas diferentes temperaturas, 20 e 30 °C. A cada 24 horas foi realizada indução com metanol 1% (v/v) e alíquotas foram retiradas para determinação da atividade de mananase.

Na FIGURA 38 é possível verificar a expressão extracelular da mananase recombinante com a FSm realizada a 20 °C. O pico de mananase (1,60 U mL<sup>-1</sup>) ocorreu em 72 horas com a maior concentração de sorbitol (5%). Porém, nesta temperatura a expressão extracelular da enzima cessou em 96 horas.

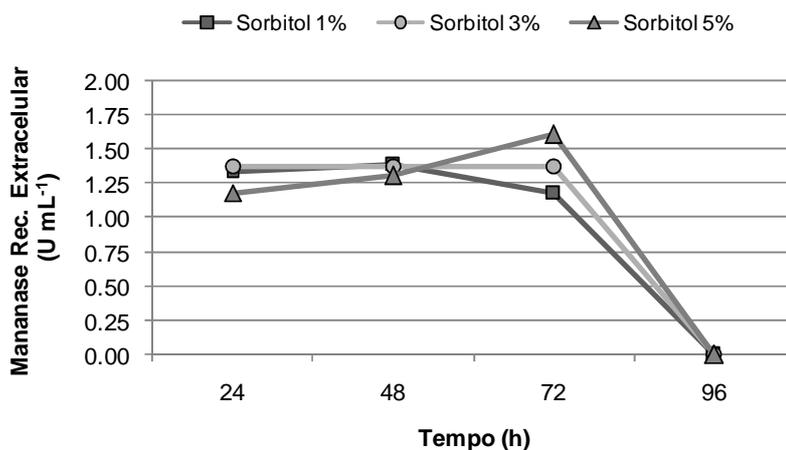


FIGURA 38 – CINÉTICA (20 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1, 3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR *P. pastoris*

A FSm realizada a 30 °C apresentou menor atividade extracelular de mananase, quando comparada à FSm realizada a 20 °C. Contudo, a mesma foi mais estável ao longo do tempo e o pico ( $1,47 \text{ U mL}^{-1}$ ) foi obtido com a concentração intermediária de sorbitol (3%, m/v) em apenas 48 horas (FIGURA 39).

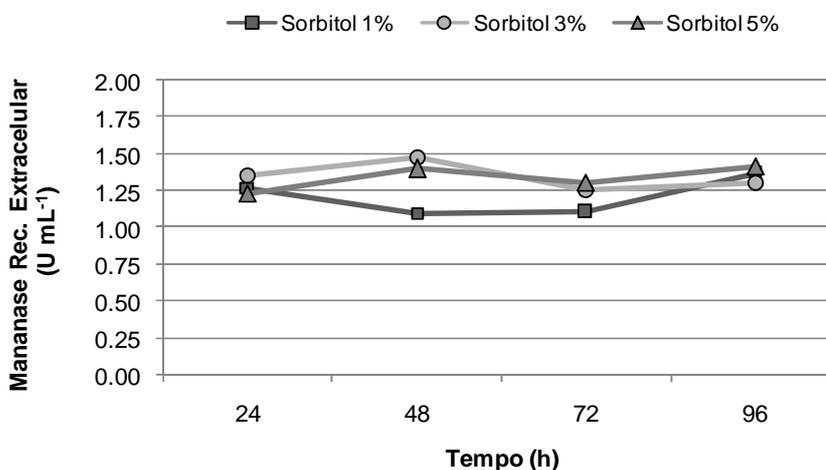


FIGURA 39 – CINÉTICA (30 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1, 3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA EXTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR *P. pastoris*

Em termos de produtividade o perfil foi semelhante para todas as condições avaliadas (sorbitol 1, 3 e 5% a 20 ou 30 °C), com o pico em 24 horas, variando entre  $0,05$  e  $0,06 \text{ U mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

A concentração 1% (m/v) de sorbitol demonstrou ser a menos eficaz para a expressão extracelular de mananase, em ambas as temperaturas testadas (20 e 30 °C). Portanto, apenas as amostras provenientes de FSm com sorbitol nas concentrações de 3 e 5% (m/v), tiveram o conteúdo intracelular da *P. pastoris* recombinante (colônia 17) analisado.

Nos dois controles negativos realizados: *P. pastoris* GS115 não transformada e *P. pastoris* GS115 transformada com o plasmídeo pPICZ $\alpha$  A vazio, foi detectada “produção” de mananase (pico de 1,40 U mL<sup>-1</sup> em 24 horas) com perfil muito próximo à colônia recombinante testada.

Uma análise *in silico* de *P. pastoris* revelou que quando foi utilizado metanol como única fonte de carbono, a maior parte dos recursos foi direcionada para a energia de geração. Em contrapartida, o sorbitol, capaz de gerar fluxo superior de aminoácidos, poderia ser potencialmente direcionado para a síntese da proteína recombinante (CHUNG *et al.*, 2010).

O presente resultado difere do obtido por Zhu *et al.* (2011), os quais utilizaram pela primeira vez ambas estratégias (redução de temperatura e co-indução por sorbitol), de forma concomitante, para elevar a produção de mananase recombinante por *P. pastoris*, atingindo 6336 U mL<sup>-1</sup>. É importante ressaltar que os pesquisadores além de otimizarem as condições fermentativas, também realizaram a otimização genética da já transformada *P. pastoris* com a mananase alcalina proveniente da cepa parental *Bacillus* sp. N16-5.

A otimização genética pode ser considerada no futuro, uma vez que as análises realizadas até o momento, em especial o sequenciamento do plasmídeo recombinante (comprovando a eficiência transformação em *E.coli* para replicação do plasmídeo recombinante, bem como todas as etapas prévias) e os controles realizados com a *P. pastoris* evidenciam problemas de outra ordem, tais como a síntese e secreção da proteína recombinante pela levedura.

#### 5.7.2.2 Análise intracelular

A maior expressão intracelular de mananase foi obtida em 72 horas, quando utilizada a maior concentração de sorbitol (5%, m/v), seja para a FSm realizada a 20 °C (1,93 U mL<sup>-1</sup>, FIGURA 40) ou a 30 °C (2,11 U mL<sup>-1</sup>, FIGURA 41).

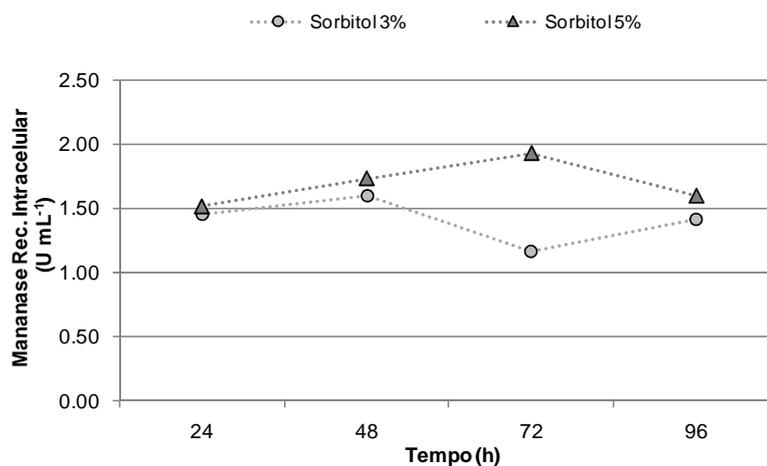


FIGURA 40 – CINÉTICA (20 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR *P. pastoris*

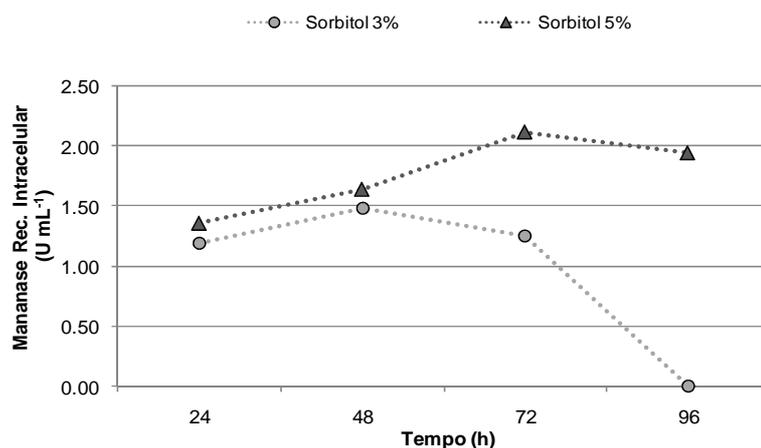


FIGURA 41 – CINÉTICA (30 °C) EM CALDO BMMY COM CO-INDUÇÃO POR SORBITOL EM DUAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (3 E 5%, m/v) PARA EXPRESSÃO HETERÓLOGA INTRACELULAR DE MANANASE RECOMBINANTE POR *P. pastoris*

Os resultados da expressão heteróloga da mananase por *P. pastoris* recombinante, deixaram dúvidas quanto à correta interpretação da levedura para a produção desta enzima e, portanto, decidiu-se avaliar por meio de SDS-PAGE, o perfil das proteínas expressas.

## 5.8 SDS-PAGE DA MANANASE RECOMBINANTE

As amostras proteicas referentes ao conteúdo intra e extracelular da *P. pastoris*, provenientes da FSm (48 – 96 horas / 20 e 30 °C), realizada em caldo BMMY com indução por metanol 1% e sorbitol 5% (m/v) foram analisadas por SDS-PAGE, no entanto, o gel referente às amostras do conteúdo extracelular não apresentou nenhuma banda, somente a do marcador molecular utilizado.

No gel referente às amostras do conteúdo intracelular (FIGURA 42), foi possível observar que os controles negativos, *P. pastoris* sem transformação e *P. pastoris* transformada com o plasmídeo pPICZα A vazio (poços 6 e 7), além de terem coloração menos intensa (o que indica menor teor proteico), não apresentaram uma das bandas (entre 70 e 100 kDa), visualizada nos poços referentes às demais amostras. As amostras de todos os tempos analisados (48 – 96 horas) apresentaram uma banda entre 70 e 100 kDa, sendo que na temperatura de 30 °C esta banda é notavelmente mais intensa (FIGURA 42). Além disso, um visível arraste se inicia entre 20 e 30 kDa para as amostras fermentadas à 20 °C e em torno de 40 kDa para as amostras fermentadas à 30 °C .

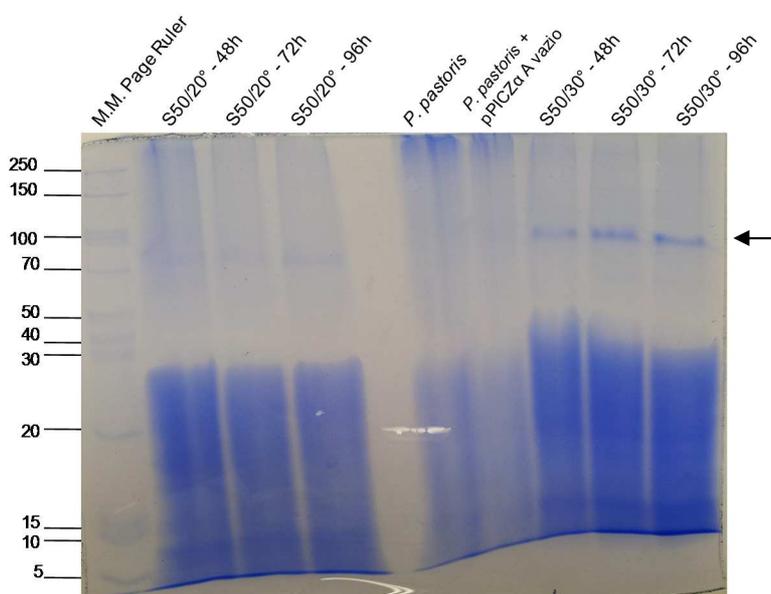


FIGURA 42 - SDS-PAGE DO CONTEÚDO INTRACELULAR DE *P. pastoris*. CINÉTICA DA FSm EM CALDO BMMY COM SORBITOL 5% (m/v) A 20 E 30 °C.

O arraste apresentado no gel pode ser um indício de glicosilação. Li *et al.* (2007) afirmam que a glicosilação é um dos eventos críticos no processo de pós-

tradução que envolve a síntese de proteínas recombinantes e que esta pode afetar várias de suas características, tal como a termoestabilidade ou até mesmo sua bio-atividade (TABELA 37):

TABELA 37 - EXEMPLOS DE ENZIMAS GLICOSILADAS EXPRESSAS EM *P. pastoris* E A RELAÇÃO COM SUA BIO-ATIVIDADE

ENZIMA	OLIGOSACARÍDEO	TIPO DE GLICOSILAÇÃO	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
$\alpha$ -Amilase	(Man) <sub>8-18</sub> GlcNAc	N-ligação	-	Tull <i>et al.</i> (2001)
Glicanahidrolase	(Man) <sub>7-14</sub> GlcNAc <sub>(2)</sub>	N-ligação	+	Betancourt <i>et al.</i> (2001)
Cutinase	/	N-ligação	++	Sagt <i>et al.</i> (2000)
Fitase	/	N-ligação	+	Rodriguez <i>et al.</i> (2000)
Celobiohidrolase	/	N-ligação	+	Boer, Teeri e Koivula (2000)
Protease aspártica	(Man) <sub>6-17</sub> GlcNAc <sub>(2)</sub>	N-ligação	+	Montesino <i>et al.</i> (1999)
Gelatinase B	(Man) <sub>8-15</sub> GlcNAc <sub>(2)</sub>	N-ligação, O-ligação	+	Van den Steen <i>et al.</i> (1998)
$\alpha$ -N-Acetilgalactosaminidase	(Man) <sub>9-14</sub> GlcNAc	N-ligação	+	Zhu, Wang e Beavis (1998)

-: Atividade da enzima glicosilada é menor que a enzima nativa;

+: Atividade da enzima glicosilada é a mesma que a enzima nativa;

++: Atividade da enzima glicosilada é maior que a enzima nativa.

FONTE: Adaptado de Li *et al.* (2007)

O baixo índice de expressão heteróloga da mananase recombinante extracelular em *P. pastoris* (transformada com o plasmídeo recombinante detentor do fator  $\alpha$  para secreção de proteínas) aliado a ausência de bandas no SDS-PAGE, indicam que a levedura possui dificuldades para secretar a enzima. O perfil eletroforético das proteínas expressas intracelularmente pela levedura (FIGURA 43) reforça esta suspeita.

Sendo assim, estudos adicionais que abrangem a recombinação e integração do plasmídeo pela levedura (análise dos clones por PCR do DNA genômico, por exemplo), a conformação da proteína recombinante (testes de glicosilação, por exemplo), e a realização de SDS-PAGE com amostras purificadas em sistema

ProBond™, devem ser explorados em trabalhos futuros, antes de iniciarem os estudos de produção da mananase recombinante em biorreator, para o qual a *P. pastoris* foi engenheirada (LIFE TECHNOLOGIES, 2014).

## 5.9 ESTUDOS DE FORMULAÇÃO LÍQUIDA DA MANANASE

Desde o início do trabalho foi definido que os estudos de formulação líquida da mananase seriam desenvolvidos com o caldo enzimático proveniente da cepa parental *A. niger* NRRL 328. Este fungo além de ser aceito como produtor de hemicelulases pela ANVISA (conforme relatado na Revisão bibliográfica da presente tese), também é considerado GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pelo FDA, facilitando a aprovação da formulação de mananases pelos devidos órgãos fiscalizadores e sua possível inserção no mercado de enzimas nacional e internacional.

### 5.9.1 Semi-purificação do extrato mananolítico

Em trabalho anterior realizado por Weingartner (2010), a mananase obtida por FES de CS com *A. niger* NRRL 328, foi purificada por micro e ultrafiltração, seguida por cromatografia de troca iônica, identificação baseada em espectrometria de massa MALDI-TOF/TOF (*Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight II*) e análises de bioinformática para sua identificação: endo- $\beta$ -1,4-mananase, pertencente à família 5 de glicosil hidrolases, com massa molecular aproximada de 41,2 kDa.

Na presente tese, os estudos de formulação líquida da mananase, foram realizados com os extratos enzimáticos obtidos pela técnica de FESS em biorreator do tipo BCR, clarificados e semi-purificados por microfiltração em membrana de 0,2  $\mu$ m para remoção de micropartículas, seguido por ultrafiltração em membranas de 30000 MWCO, baseado na identificação da mananase realizada do trabalho anterior. A fração permeada, com predominância de mananases, foi denominada extrato mananolítico semi-purificado e utilizada em todas as etapas do estudo de estabilidade e definição da formulação líquida da enzima.

A FIGURA 43 ilustra as perdas obtidas em cada etapa da separação por membranas. Uma perda de aproximadamente 33% da atividade de mananase ocorreu após a microfiltração, porém, tal fato não se repetiu na etapa seguinte de ultrafiltração.

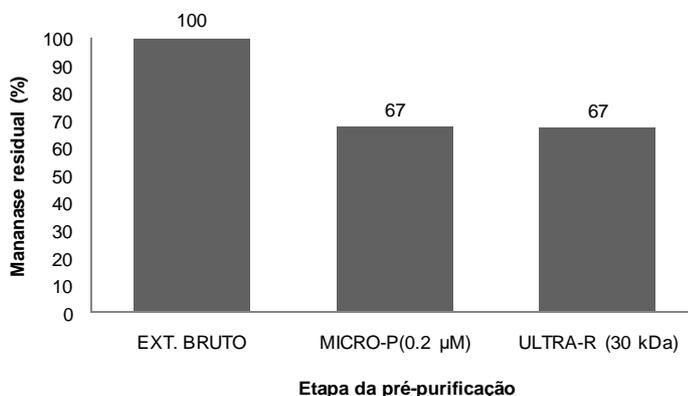


FIGURA 43 – MÉDIA DE ATIVIDADE RESIDUAL DE MANANASE (%) EM CADA UMA DAS ETAPAS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS, REALIZADAS PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO MANANOLÍTICO SEMI-PURIFICADO

Este resultado indica que o processo de semi-purificação escolhido foi eficaz, uma vez que perdas sempre ocorrem em processos deste tipo (DAKO *et al.*, 2012). Sá-Pereira *et al.* (2003) relatam diminuição na atividade enzimática em torno de 50 – 70% após etapa de ultrafiltração que envolveu a também enzima hemicelulolítica, xilanase.

Segundo Neto (2001), o nível de purificação de uma enzima depende primariamente do uso a que se destina. Sendo assim, purificações destinadas a estudos acadêmicos que envolvem caracterização e identificação são geralmente extensivas, pois somente pequenas quantidades de enzima ativa são necessárias; nestes casos custo e tempo têm importância secundária. Por outro lado, as enzimas destinadas à aplicações industriais são obtidas em grandes quantidades e a pureza é considerada secundária quando comparada aos custos.

A ultrafiltração é uma das principais ferramentas de separação, a qual envolve etapas de fracionamento e concentração na indústria alimentar, farmacêutica e biotecnológica, bem como na produção de água purificada e no tratamento de despejos residuais (CHERYAN, 1998; BAKER, 2004; SUSANTO; ULBRICHT, 2009). Tal ferramenta consiste no transporte de soluções através de membranas com poros de diâmetros de 0,001 a 0,1 µm, sob pressão de transmembrana, onde a água e

outras moléculas pequenas menores que o diâmetro dos poros passam pela membrana, enquanto que moléculas com tamanhos superiores ficam retidas (ASENJO, 1990; HARRIS; ANGAL, 1994, KILIKIAN; PESSOA JR., 2001).

#### 5.9.2 Estabilidade acelerada (Fase1): Seleção individual dos aditivos para compor a formulação líquida de mananase

O estudo da estabilidade de um produto realizado com a finalidade de garantir, além da ação esperada, também a integridade química, física, microbiológica e toxicológica, dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo (LUCAS; BISHARA; SEEVERS, 2004; ANSEL; POPOVICH; ALEN, 2007).

Na fase de estabilidade acelerada (em condição adversa, com o intuito de testar a eficácia dos aditivos em menor intervalo de tempo), os aditivos foram primeiramente avaliados quanto à sua capacidade individual de estabilizar a atividade de mananase durante 15 dias. Esta etapa fornece abordagens de formulação e indica tipos de adjuvantes, aditivos de proteção específicos e de acondicionamento, que provavelmente melhorarão a integridade do produto (REYNOLDS *et al.*, 2002).

Os aditivos foram divididos em três grupos, onde cada grupo foi estudado em duas concentrações distintas, dentro da faixa máxima permitida segundo literatura. Para compor cada um dos três grupos de estudo, a escolha dos aditivos se deu com base na sua similaridade e/ou função desempenhada na formulação, apesar de muitas vezes um componente abranger mais de uma função dentro da classificação, como por exemplo, o EDTA que é considerado agente quelante, antioxidante e antimicrobiano, ou o sorbato de potássio, considerado preservativo antimicrobiano e conservante (ANVISA, 1988; 2005; ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009).

Como a formulação líquida de mananase pode ser empregada em diversos segmentos industriais, os aditivos com restrição para uso em alimentos conforme designação da ANVISA (1988, 2005), não foram inclusos no estudo.

As análises para determinação da atividade de mananase residual (%) foram realizadas nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias de armazenamento a 50 °C. O aditivo de

cada grupo que forneceu a melhor resposta para a estabilização da atividade de mananase durante os 15 dias de estudo, foi selecionado para a etapa seguinte.

Neste contexto, o Grupo 1 foi formado pelos sais considerados conservantes e estabilizantes; o Grupo 2 teve na sua maioria polióis e o Grupo 3 foi composto pelos aditivos considerados antioxidantes e preservativos com ação antimicrobiana e inibidora de proteases.

De modo geral, os aditivos do Grupo 1 apresentaram desempenho bastante satisfatório, uma vez que todos os aditivos (cloreto de sódio, citrato de sódio, sorbato de potássio e benzoato de sódio), em qualquer concentração avaliada, superaram a atividade de mananase apresentada pelo controle (78% ao final dos 15 dias) (TABELA 38; FIGURA 44, A E B) porém, por se tratar de um estudo de seleção, o melhor aditivo do Grupo 01 selecionado para a próxima etapa foi o citrato de sódio devido à manutenção de 100% da atividade mananolítica na menor concentração (0,15%) durante os 15 dias de estudo. (TABELA 38).

O desempenho do segundo Grupo de estudo (glicerol, sorbitol, polietilenoglicol e ácido benzóico) já não foi tão satisfatório. A atividade média de mananase apresentada pelo controle foi de 84% ao final dos 15 dias. Entretanto, o ácido benzóico em ambas as concentrações estudadas (0,1 e 0,01%), e o polietilenoglicol na menor concentração (2%), além de não terem sido capazes de estabilizar a mananase, também inibiram a atividade da enzima em 4,5 e 27%, respectivamente. Glicerol e sorbitol (ambos em 2,5 M) foram os melhores aditivos do Grupo 2, com média de estabilidade da mananase em 89 e 88%, respectivamente (TABELA 38; FIGURA 44, A E B).

Dentre os dois melhores aditivos do segundo Grupo, sorbitol e glicerol, este último foi selecionado para os estudos seguintes devido à sua apresentação líquida e à menor quantidade requerida para a concentração de 2,5 M (230,25 g/L contra 364,34 g/L do sorbitol), uma soma de fatores, que facilita a dissolução do aditivo no extrato enzimático mananolítico.

O último grupo de estudo individual dos aditivos, Grupo 3, composto por metionina, EDTA, ácido ascórbico e coquetel inibidor de proteases foi o menos satisfatório, uma vez que nenhum dos aditivos estudados, em qualquer concentração avaliada, foi capaz de estabilizar a mananase (TABELA 38; FIGURA 44, A E B). A média de atividade mananolítica do controle foi de 72% ao final dos 15 dias, porém, como o intuito inicial era selecionar ao menos um aditivo de cada grupo

de estudo, decidiu-se escolher o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA) que foi o melhor dentre os testados no Grupo 3, com manutenção de 69% da atividade enzimática na maior concentração estudada (0,1%) e de 70% na menor concentração (0,01%) (TABELA 38).

TABELA 38 – PERCENTUAL MÉDIO DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE MANANOLÍTICA FORNECIDO PELAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1)

GRUPO	ADITIVO	MANANASE			MANANASE		
		[1]	RESIDUAL (%)	pH	[2]	RESIDUAL (%)	pH
1*	Cloreto de sódio (Clor. Na)	1%	96	4,0	0,1%	98	4,0
	Citrato de sódio (Cit. Na)	1,5%	93	5,0	0,15%	100	4,5
	Sorbato de potássio (Sorb. K)	0,5%	90	5,0	0,05%	88	5,0
	Benzoato de sódio (Benz. Na)	1%	90	4,0	0,1%	86	4,0
2**	Glicerol (Gli)	3,5 M	86	4,0	2,5 M	89	4,5
	Sorbitol (Sorb)	3,5 M	87	4,0	2,5 M	88	4,5
	Polietilenoglicol 8000 (PEG)	3%	84	4,0	2%	57	4,0
	Ác. Benzóico (Ac. Benz.)	0,1%	80	3,5	0,01%	79	4,0
3***	Metionina (Met)	1,5%	66	7,0	0,5%	67	6,5
	Ác. etilendiamino tetra-acético (EDTA)	0,1%	69	7,0	0,01%	70	5,0
	Ác. Ascórbico (Ac. Asc.)	0,1%	64	6,0	0,01%	66	5,0
	Coquetel inibidor de protease (Inib)	1:2	64	7,0	1:4	59	7,0

\*Controle: 78% de mananase residual; pH 4,0

\*\*Controle: 84% de mananase residual; pH 5,5

\*\*\*Controle: 72% de mananase residual; pH 7,0

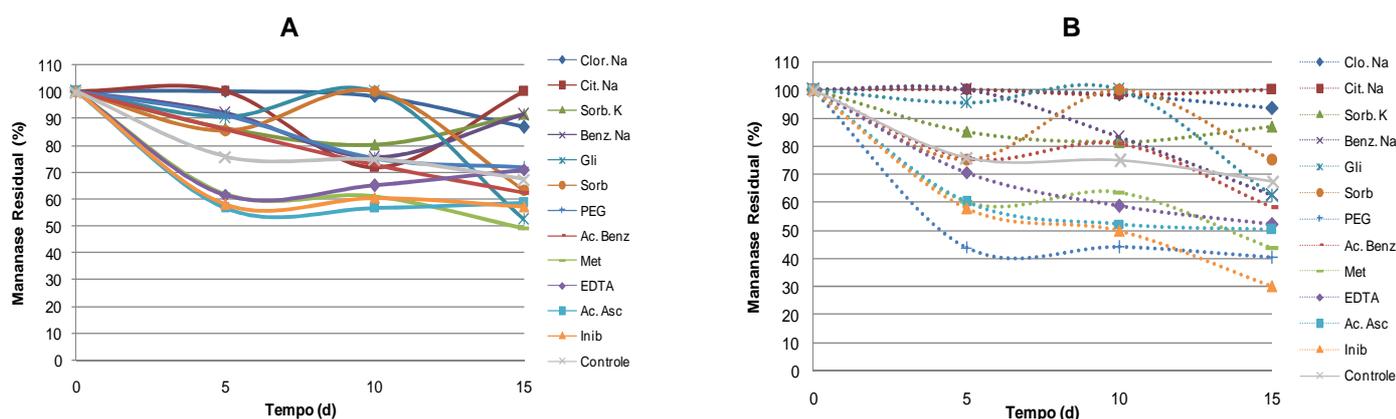


FIGURA 44 – ESTABILIDADE ACELERADA (FASE 1): ADITIVOS ESTUDADOS INDIVIDUALMENTE PARA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE ARMAZENADA A 50 °C DURANTE 15 DIAS A) EFEITO DA MAIOR CONCENTRAÇÃO (m/v); B) EFEITO DA MENOR CONCENTRAÇÃO (m/v)

Clor. Na – cloreto de sódio 1% e 0,1%; Cit. Na – citrato de sódio 1,5% e 0,15%; Sorb. K – sorbato de potássio 0,5% e 0,05%;

Benz. Na – benzoato de sódio 1% e 0,1%; Gli – glicerol 3,5 M e 2,5 M; Sorb – sorbitol 3,5 M e 2,5 M;

PEG – polietilenoglicol 8000 3% e 2%; Ac. Benz – ácido benzóico 0,1% e 0,01%; Met – metionina 1,5% e 0,15%;

EDTA – ácido etilendiamino tetra-acético 0,1% e 0,01%; Ac. Asc – ácido ascórbico 0,1% e 0,01%;

Inib – coquetel inibidor de proteases 1:2 e 1:4.

A condição adversa (temperatura de armazenamento de 50 °C) foi estabelecida em estudo de caracterização da enzima, realizado anteriormente por Weingartner (2010). Considerada dentro da faixa ótima de temperatura para a mananase, tal condição favorece a bioatividade da enzima, porém, quando exposta por demasiado tempo (15 dias), tende a reduzi-la significativamente.

Dentre os aditivos selecionados, o mais comumente relatado na preservação de enzimas é o glicerol. Gulla *et al.* (2004) relatam que a diminuição na desnaturação da enzima pelos polióis está relacionada à manutenção da força iônica da enzima, mantendo a estrutura terciária e consequentemente preservando o seu sítio catalítico. O glicerol é citado como excelente aditivo na conservação de outras enzimas, tais como catalase e transglutaminase (COSTA *et al.*, 2002; BOURNEOW; BENJAKUN; KITTIKUN, 2012), glicose oxidase (YE; COMBES; MONSAN, 1988),  $\alpha$ -amilase (ASHTER; MEUNIER, 1990) e, também para mananase, com ação considerada satisfatória (LIU *et al.*, 2008).

O citrato de sódio na concentração de 20%, em conjunto com 18% de acetato de sódio e 16% de glicerol são relatados como os melhores estabilizantes da enzima dextranase (WANG *et al.*, 2014).

Wang (1999) relata que a presença de agentes quelantes como o EDTA podem proteger por completo as proteínas da ação de agentes oxidantes.

### 5.9.3 Estabilidade acelerada (Fase1): estudo de interação dos aditivos selecionados

Após a seleção individual dos aditivos citrato de sódio, glicerol e EDTA, foi realizado um estudo para avaliar a interação entre os mesmos na manutenção da atividade de mananase. Também foi realizado a 50 °C, com análises nos tempos 0, 5, 10 e 15 dias, as concentrações foram escolhidas com base no resultado da avaliação individual dos aditivos. Glicerol e EDTA tiveram as mesmas concentrações novamente avaliadas (2,5 e 3,5 M; 0,01 e 0,1%, respectivamente), pois no estudo anterior, tanto a maior quanto a menor concentração, apresentaram resultado semelhante para a estabilidade da mananase. Já o citrato de sódio foi testado em 0,15 e 0,5%, uma vez que o melhor resultado na sua avaliação individual se deu com sua menor concentração (0,15%).

Assim, foram avaliadas duas diferentes interações entre os três aditivos. A interação 1, onde todos os aditivos foram testados em maior concentração (citrato de sódio 0,5%, glicerol 3,5 M e EDTA 0,1%) e a interação 2 (citrato de sódio 0,15%, glicerol 2,5 M e EDTA 0,01%), em menor concentração.

A média de atividade mananolítica do controle foi de 80% durante os 15 dias, e as interações demonstraram ser extremamente eficazes na preservação da atividade de mananase em condição acelerada: a interação 1 manteve 94% da atividade de mananase e a interação 2, composta pelos aditivos na sua menor concentração (citrato de sódio 0,15%, glicerol 2,5 M e EDTA 0,01%), manteve 99% de atividade enzimática. Além de ser mais interessante do ponto de vista econômico, a interação 2 apresentou menor variação entre os períodos avaliados (0, 5, 10 e 15 dias) e portanto, foi selecionada para a fase seguinte (TABELA 39 e FIGURA 45).

É importante salientar que a integração dos aditivos em condição adversa de 50 °C utilizada nos estudos de estabilidade acelerada, propiciou excelente índice de manutenção da atividade de mananase (99%), quando comparado com os mesmos aditivos testados individualmente (citrato de sódio, 100%; glicerol, 89%; EDTA, 70%).

O pH se manteve mais ácido, entre 3,0 e 3,5 porém, foi o mesmo apresentado pelo extrato mananolítico semi-purificado (controle), o que indica que as interações de aditivos estudadas não afetaram o pH natural, contribuindo para o excelente resultado.

TABELA 39 – PERCENTUAL MÉDIO DE ESTABILIDADE DA ATIVIDADE MANANOLÍTICA FORNECIDO PELAS DIFERENTES INTERAÇÕES DOS ADITIVOS ESTUDADOS EM CONDIÇÃO ACELERADA (FASE 1)

ADITIVOS	[1]			[2]		
	MANANASE RESIDUAL (%)	pH	MANANASE RESIDUAL (%)	pH		
Citrato de sódio (Cit. Na)	0,5%	3,5	0,15%	3,5		
Glicerol (Gli)	3,5 M		2,5 M		99%	
Ác. etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	0,1%		0,01%			

\*Controle: 80% de mananase residual; pH 3,0

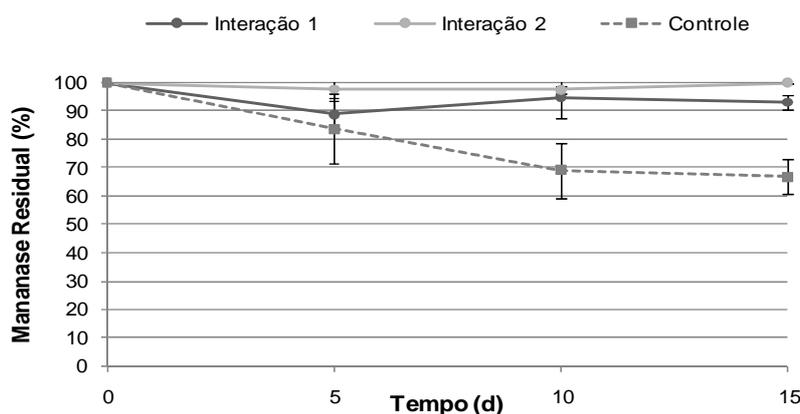


FIGURA 45 – ESTABILIDADE ACELERADA (FASE 1): ADITIVOS SELECIONADOS ESTUDADOS EM CONJUNTOS PARA MANUTENÇÃO DA ATIVIDADE DE MANANASE ARMAZENADA A 50 °C DURANTE 15 DIAS

Interação 1 – citrato de sódio 0,5%, glicerol 3,5 M e EDTA 0,1%  
 Interação 2 – citrato de sódio 0,15%, glicerol 2,5 M e EDTA 0,01%

#### 5.9.4 Estabilidade normal (Fase 2)

No estudo de estabilidade normal, a formulação composta pelo extrato enzimático semi-purificado, citrato de sódio (0,15%), glicerol (2,5 M) e EDTA (0,01%), foi preparada e armazenada ao abrigo da luz em duas diferentes condições: sob refrigeração com temperatura de 4 °C e temperatura ambiente. Ao longo do estudo de 120 dias o pH se manteve ácido (em torno de 3,0) para todas as amostras analisadas (controle e formulação).

Os frascos controle, armazenados sem qualquer aditivo, responderam melhor à manutenção na atividade de mananase, tanto sob refrigeração (média de 90%) quanto em a temperatura ambiente (média de 69%).

Já os frascos contendo o extrato mananolítico semi-purificado, na presença da formulação considerada ideal no estudo de estabilidade acelerada, quando submetidos a condições normais de armazenamento, não apresentaram estabilidade satisfatória. Durante os 120 dias de estudo, a atividade média de mananase foi de 77% quando armazenada sob refrigeração, e de apenas 56% sob armazenamento em temperatura ambiente (FIGURA 46).

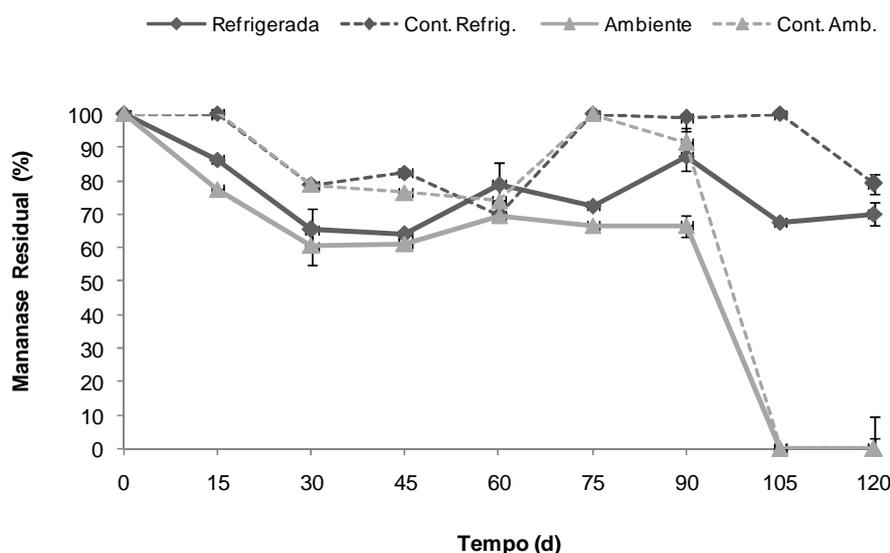


FIGURA 46 – ESTABILIDADE NORMAL (FASE 2): ATIVIDADE RESIDUAL DE MANANASE (%) NO ESTUDO DE ESTABILIDADE DA FORMULAÇÃO LÍQUIDA ARMAZENADA EM TEMPERATURA AMBIENTE E SOB REFRIGERAÇÃO (4 °C) POR 120 DIAS

A grande diferença na média da atividade mananolítica, obtida dentre as amostras armazenadas em diferentes condições, foi devida à contaminação microbiana (aparentemente do tipo fúngica), apresentada após 90 dias de estudo pelas amostras armazenadas em temperatura ambiente (formulada e controle). Tal ocorrido inviabilizou a análises destas amostras nos intervalos de tempo seguintes (105 e 120 dias) e contribuiu significativamente para o contraste dos índices médios de estabilidade fornecidos por cada condição.

Quando comparado à temperatura ambiente, o armazenamento sob refrigeração do extrato formulado pode ter influenciado pouco na manutenção da atividade enzimática (uma vez que o resultado não foi superior ao apresentado pelo controle), porém, a condição de refrigeração foi determinante para a preservação das amostras frente a contaminações microbianas.

Os dados do estudo de estabilidade da Fase 1 somados aos dados obtidos nesta etapa (Fase 2), sugerem que o extrato mananolítico semi-purificado possui características químicas e físicas que por si só são capazes de manter a atividade da enzima em temperaturas baixas e amenas, mas que deixam de existir quando esta não é sua condição de armazenamento, reforçando a importância dos aditivos na formulação enzimática líquida. Silva *et al.* (2009b) afirmam que a formulação pode auxiliar a enzima a se manter estável quando exposta por curto prazo às

condições opostas pré-estabelecidas no rótulo do produto (ocorridas por exemplo, durante o transporte).

Poderão ser realizados no futuro, por tempo prolongado, estudos complementares para o extrato mananolítico semi-purificado e também para o produto formulado, acerca da identificação dos compostos de degradação gerados, do armazenamento em temperatura “ambiente” programada (com controle da temperatura, pressão atmosférica e umidade relativa do ar), da inserção de antimicrobianos e inibidores de proteases eficazes e também do tipo de embalagem à ser utilizada, procedendo às recomendações para o Teste de Prateleira.

#### 5.9.5 Determinação da meia-vida da mananase

O extrato mananolítico semi-purificado teve sua estabilidade testada a 50 e 60 °C durante 20 minutos afim de determinar a meia-vida da enzima.

A 50 °C o extrato semi-purificado perde em torno de 15,4% de sua atividade nos primeiros 20 minutos de incubação. Na temperatura de 60 °C, a perda de atividade é ainda mais significativa (30,2%), no mesmo intervalo de tempo.

Na TABELA 40, está listada a constante (k), obtida de acordo com a plotagem no gráfico (FIGURA 47), bem como a meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da mananase.

TABELA 40 - CONSTANTE (k) E MEIA-VIDA ( $t_{1/2}$ ) DO EXTRATO MANANOLÍTICO SEMI-PURIFICADO

TEMPERATURA	k (min <sup>-1</sup> )	MEIA-VIDA (min)
50 °C	0,01	69
60 °C	0,02	35

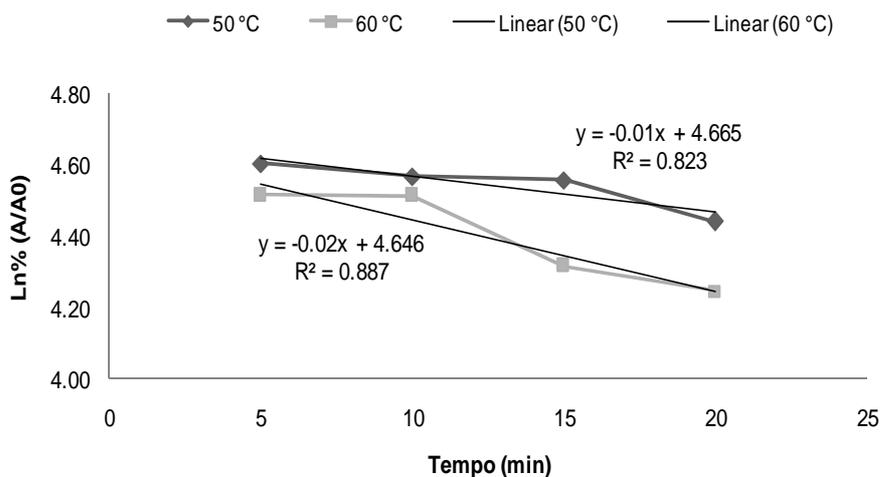


FIGURA 47 – INATIVAÇÃO TÉRMICA (50 E 60 °C) DA MANANASE (EXTRATO SEMI-PURIFICADO)

Na FIGURA 48, é possível observar que à 50 °C a enzima é mais estável do que a 60 °C. Contudo, fica evidente que a mananase tem sua degradação iniciada logo no início, seja a 50 °C (em 10 minutos) ou a 60 °C (em 5 minutos).

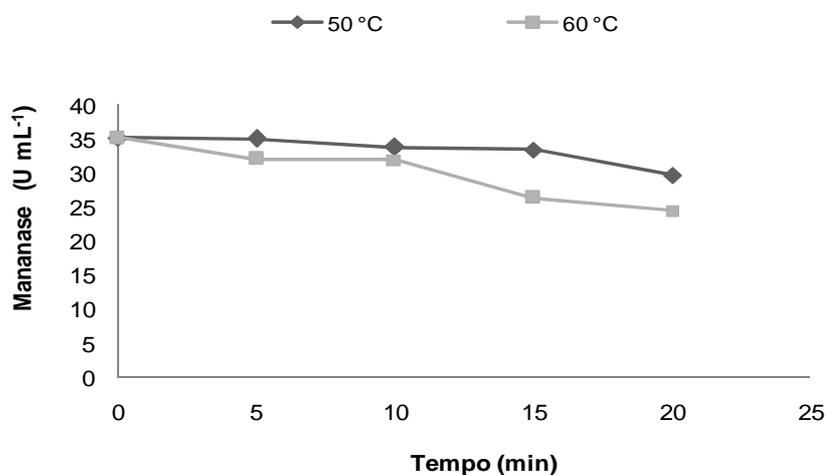


FIGURA 48 – PERFIL DE ATIVIDADE DA ENZIMA MANANASE (EXTRATO SEMI-PURIFICADO) A 50 E 60 °C EM RELAÇÃO AO TEMPO (MINUTOS)

Tal comportamento corrobora com os resultados apresentados pelo extrato mananólítico semi-purificado (controle) no estudo de estabilidade acelerada, em que a sua degradação é maior logo nos primeiros 5 dias (FIGURAS 44 e 45), e no estudo de estabilidade normal, realizado em temperatura ambiente e sob refrigeração, onde a mananase mantém 100% de sua atividade nos primeiros 15

dias de estudo e tem sua degradação (em torno de 20%) iniciada somente após este período (FIGURA 46).

#### 5.9.6 Testes de toxicidade da formulação final líquida de mananase

Segundo Sousa (2002), análises ecotoxicológicas vêm sendo empregadas no monitoramento de efluentes industriais uma vez que é requisito para a obtenção e manutenção de licenças junto aos órgãos ambientais, que visam avaliar a eficiência das estações de tratamento criadas para minimizar o impacto ambiental. No Brasil, o uso de testes ecotoxicológicos na avaliação da qualidade de águas e efluentes foi regulamentado oficialmente, por meio da Resolução nº 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

Para determinar a toxicidade da formulação final líquida de mananase, foi realizado um teste frente ao organismo *Artemia salina*, afim de encontrar a dose letal (LC<sub>50</sub>). Este microcrustáceo de água salgada é um dos animais aquáticos mais importantes para a indústria de aquicultura (ASEM; RASTEGAR-POUYANI; DE LOS RÍOS-ESCALANTE, 2010). De caráter extremamente eurialino e distribuição cosmopolita, os organismos do gênero *Artemia* atuam como elo trófico entre as comunidades planctônicas e as cadeias superiores, sendo que a considerável dispersão do gênero pelo mundo pode ser atribuída à reprodução partenogênica com cistos, a qual ocorre na ausência do macho (VEIGA; VITAL, 2002; PIMENTEL *et al.*, 2011).

Baseado na contagem dos organismos mortos, a formulação líquida de mananase composta por citrato de sódio (0,15%), glicerol (2,5 M) e EDTA (0,01%), na concentração de até 0,75%, não apresentou nenhum efeito tóxico para a *A. salina*. Já a faixa de concentração entre 1 – 1,35% causou a letalidade de 50% dos organismos testes (LC<sub>50</sub> *A. salina*), com intervalo de confiança de 95% (FIGURA 49) e, portanto, para que não ocorra danos ao ambiente, esta é a concentração da formulação líquida de mananase sugerida para utilização, segundo o teste de toxicidade.

DATE:	P 0 P21	TEST NUMBER:		DURATION:	24 H
TOXICANT : extrato formulado					
SPECIES: Artemia salina					
RAW DATA:	Concentration (%)	Number Exposed	Mortalities		
	.00	10	0		
	.25	10	0		
	.50	10	0		
	.75	10	0		
	1.00	10	4		
	2.00	10	10		
SPEARMAN-KARBER TRIM:		.00%			
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:		LC50:	1.16		
		95% LOWER CONFIDENCE:	1.00		
		95% UPPER CONFIDENCE:	1.35		

FIGURA 49 – ESTUDO DE TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO FINAL LÍQUIDA DE MANANASE, REALIZADO COM O MICROCRUSTÁCEO *A. salina*

A enzima foi formulada com aditivos capazes de manter sua estabilidade, baseado em recomendações da ANVISA para consumo humano e animal. Contudo, a mesma formulação de mananase não impede que ela seja destinada às demais indústrias, como por exemplo, de detergentes.

Estudos adicionais de toxicidade, em que o destino final não é um ambiente eurialino, devem ser realizados de acordo com a necessidade. O mesmo vale para mudanças futuras na formulação, tais como diferentes aditivos, ou forma de apresentação (pó, por exemplo).

## 6 CONCLUSÃO

Em frascos Erlenmeyer, a produção de mananases por via convencional com *A. niger* NRRL 328 e o emprego da técnica de FES com CS foi bastante eficiente. Porém, visando o escalonamento do processo produtivo, a técnica de FESS com CS (5%, m/v) como substrato sólido em suspensão, se mostrou uma interessante e viável alternativa (46 U mL<sup>-1</sup> de mananase).

Dentre os demais subprodutos testados (CC, PC, BM e FS) como possíveis substratos sólidos para a produção de mananases por FES ou FESS, apenas o FS foi atrativo. Porém, o FS possui custo mais elevado em comparação à CS e, portanto, a CS foi selecionada como o substrato ideal para a produção desta enzima.

Os estudos de otimização realizados em frascos Erlenmeyer incrementaram a atividade da enzima em torno de 67% por meio de agitação em 120 rpm, suplementação do meio fermentativo com uréia (0,7 g/L), sulfato de manganês (1 g/L) e sacarose (20 g/L), e a utilização de CS na concentração de 15% (m/v) com o menor tamanho de partícula (granulometria inferior à 0,8 mm).

A utilização de biorreatores para escalonar a produção da enzima se mostrou eficaz. O modelo Coluna de Bolhas (BCR) apresentou melhor desempenho quando utilizado o fungo filamentoso *A. niger* NRRL 328. A aeração pneumática do BCR promove a homogeneização do meio sem oferecer riscos relacionados ao cisalhamento do micélio fúngico. Além disso, neste modelo de biorreator foi possível utilizar maior quantidade de CS (15%, m/v), a qual demonstrou ser excelente para produção de mananases devido ao considerável teor de mananas na sua composição.

O emprego da técnica de FSm também mostrou-se como ótima perspectiva para a produção de mananases com extrato aquoso de CS. A ausência de sólidos suspensos no meio de produção facilitou o processo de agitação. A suplementação do meio com sacarose e LBG em baixas concentrações, surge como uma alternativa para viabilizar a produção da enzima com o emprego de biorreatores do tipo tanque agitado (STR), por exemplo.

No âmbito da produção de mananases por via recombinante, as estratégias para obtenção do plasmídeo recombinante e clonagem em *E. coli* DH5 $\alpha$ , foram realizadas com sucesso, bem como a transfecção do plasmídeo recombinante

(portador da sequência codificadora de mananase) para a levedura hospedeira *P. pastoris* GS115.

A expressão heteróloga da mananase recombinante gerou um incremento de 83% ( $2,11 \text{ U mL}^{-1}$ ) quando comparado à enzima nativa ( $1,60 \text{ mL}^{-1}$ ), proveniente da linhagem parental *A. niger* NRRL 328, em condições fermentativas semelhantes. No entanto, os ensaios para determinação da atividade de mananase, aliados ao perfil proteico obtido por SDS-PAGE, indicaram que a enzima não foi adequadamente secretada pela *P. pastoris*, mas sim, retida no interior da levedura hospedeira. Tal comportamento, apesar de ser comum no estágio inicial do estudo das proteínas recombinantes, requer detalhada avaliação e o emprego de diversas análises em nível molecular que visam identificar e solucionar esta questão.

No âmbito do produto final, a formulação líquida de mananases, composta pela adição de citrato de sódio (0,15%), glicerol (2,5 M) e EDTA (0,01%), estabilizou em média 99% da atividade enzimática do extrato mananolítico semi-purificado, quando este foi submetido à condição adversa de armazenamento ( $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ) no período total de 15 dias. A mesma formulação em concentrações inferiores a 1,35%, não apresentou toxicidade para o organismo teste *Artemia salina*.

Quando armazenada sob refrigeração à  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  por 120 dias, as amostras utilizadas como controle, apenas o extrato mananolítico semi-purificado, na ausência de aditivos, apresentou o maior índice de estabilidade (média de 90%). Tal comportamento pode indicar que o extrato mananolítico possui substâncias que auxiliam na manutenção de sua bio-atividade, porém, os mesmos podem se degradar quando expostos à elevada temperatura por tempo demasiado, o que eleva a importância da formulação líquida obtida.

## 7 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Os resultados deste trabalho abrem caminhos para diversos estudos e complementam a produção de mananases por via convencional e recombinante. As sugestões para pesquisas futuras são apresentados a seguir:

- Adequar a conformação física e outros aspectos do biorreator modelo BCR tais como, tipo de membrana difusora, tamanho dos poros para difusão das bolhas de ar, saída facilitada para amostragem (a fim de viabilizar estudos cinéticos), etc. para a produção de mananases e outros bioprodutos pela técnica de FESS;
- Avaliar a produção de mananases pela cepa parental por FSm com o emprego de extrato aquoso de CS, em biorreator do tipo STR ou BCR;
- Identificar as mudanças pós-traducionais necessárias e otimizar em nível molecular o plasmídeo construído, de modo a incrementar a secreção heteróloga da mananase recombinante;
- Comparar a produção de mananase recombinante em meio sintético e meio composto por extrato aquoso de CS, utilizando biorreator do tipo STR ou BCR.
- Realizar estudo detalhado da composição do extrato mananolítico e seus produtos de degradação.
- Testar outras interações de aditivos para formulação líquida de mananases;
- Avaliar diferentes condições de secagem e encapsulamento em *spray dryer* do produto formulado em pó contendo mananases.

## 8 REFERÊNCIAS

ADEMARK, P.; VARGA, A.; MEDVE, J.; HARJUNPÄÄ, V.; DRAKENBERG, T.; TJERNELD, F.; STÅLBRAND, H. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*. Purification and properties of a  $\beta$ -mannanase. **Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 199-210, 1998.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZALEZ, G. Production of tannase by *Aspergillus niger* Aa-20 in submerged and solid-state fermentation: influence of glucose and tannic acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 296-302, 2001.

AHAMED, A.; VERMETTE, P. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, p. 379-387, 2010.

ALAZARD, D.; RAIMBAULT, M. Comparative study of amylolytic enzyme production by *Aspergillus niger* in liquid and solid-state fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 113-117, 1981.

ALCANCE PECUÁRIA – Insumos para nutrição. Disponível em: <[http://www.alcancepecuaria.com.br/produtos.php?id\\_categoria=14](http://www.alcancepecuaria.com.br/produtos.php?id_categoria=14)> Acesso em: 14/04/2015.

AL-SAMARRAI, T. H.; SCHMID, J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 30, p. 53-56, 2000.

ALSARRANI, A. Q. Production of mannan-degrading enzyme by *Aspergillus niger*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 5, p. 1- 6, 2011.

AMERICAN BIOSYSTEMS INC. Disponível em: <<http://www.americanbiosystems.com/products/agricultural-enzymes/beta-mannanase/>>. Acesso em: 27/03/2015.

ANGELO, R. S. **Xilanases de *Aspergillus* sp. 2M1: produção, caracterização e aplicação no branqueamento de polpas kraft**. Dissertação de mestrado em Química, Universidade Estadual de Campinas, 1995, p. 58-61.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN-JR, L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO CNS/MS N.º 04, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2d98d4804745761d8413d43fbc4c6735/Resolucao\\_04\\_1988.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/2d98d4804745761d8413d43fbc4c6735/Resolucao_04_1988.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: 02/11/2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Séries temáticas – Guia de estabilidade de produtos cosméticos, 2004**. Disponível em: <[www.portal.anvisa.gov.br](http://www.portal.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 02/11/2014.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 93, de 21 de dezembro de 2005**. Disponível em:

<[http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[13128-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[13128-1-0].PDF)>. Acesso em: 02/11/2014.

ARACHNOBOARDS, 2010. Disponível em:

<[http://www.arachnoboards.com/ab/showthread.php?245648-Eubbranchipus\(-\)-from-Lincoln-County-WA](http://www.arachnoboards.com/ab/showthread.php?245648-Eubbranchipus(-)-from-Lincoln-County-WA)>. Acesso em: 22/11/2014.

ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. **Journal of Biological Research**, v. 9, p. 113-114, 2008.

ASEM, A.; RASTEGAR-POUYANI, N.; DE LOS RÍOS-ESCALANTE, P. The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v.38, n.3, p. 501-506, 2010.

ASENJO, J. A. **Separation process in biotechnology**. Nova York: Marcel Dekker, 1990.

ASTHER, M.; MEUNIER, J.C. Increased thermal stability of *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase in the presence of various additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, p. 902-905, 1990.

ASTHER, M.; HAON, M.; ROUSSOS, S.; RECORD, E.; DELATTRE, M.; LESAGE-MEESSEN, L.; LABAT, M. Feruloyl esterase from *Aspergillus niger*: a comparison of the production in solid state and submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 685-691, 2002.

ATHÈS, V.; GUERRA, P.; COMBES, D. Effect of soluble additives on enzyme thermo- and/or baro-deactivation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.7, p.1-9,1999.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2. ed. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2004.

BALDRIAN, P.; VALÁSKOVÁ, V.; MERHAUTOVÁ, V.; GABRIEL, J. Degradation of lignocelluloses by *Pleurotus ostreatus* in the presence of cooper, manganese, lead and zinc. **Research in Microbiology**, v. 156, n. 5, p. 670-676, 2005.

BATISTA, M. C. T. **Produção de dextranases a partir de bagaço de malte: caracterização e avaliação do potencial de aplicação em indústria sucroalcooleira**. Tese de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2014. 169 p.

BETANCOURT, L. H.; GARCIA, R.; GONZALES, J.; MONTESINO, R.; QUINTERO, O.; TAKAO, T.; SHIMONISHI, Y.; CREMATA, J. A. Dextranase ( $\alpha$ -1,6 glucan-6-glucanohydrolase) from *Penicillium minioluteum* expressed in *Pichia pastoris*: two host cells with minor differences in *N*-glycosylation. **FEMS Yeast Research**, v.1, p. 151-160, 2001.

BIEN-CUONG, D.; THI-THU, D.; BERRIN, J. G.; HALTRICH, D.; KIM-ANH, T.; SIGOILLOT, J. C.; YAMABHAI, M. Cloning, expression in *Pichia pastoris*, and characterization of a thermostable GH5 mannan endo-1,4- $\beta$ -mannosidase from *Aspergillus niger* BK01. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. 59, p. 1-12, 2009.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substances, microorganisms, enzymes, and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-104, 1981.

BOER, H.; TEERI, T. T.; KOIVULA, A. Characterization of *Trichoderma reesei* cellobiohydrolase Cel7A secreted from *Pichia pastoris* using two different promoters. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, p. 486-494, 2000.

BOURNEOW, C; BENJAKUL, S.; KITTIKUN, A. H. Impact of some additives on the stability of microbial transglutaminase from *Providencia* sp. C1112. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 3, n. 5, p. 226-233, 2012.

BRIZZARD, B. L.; CHUBET, R. G.; VIZARD, D. L. Immunoaffinity purification of FLAG epitope-tagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution. **Biotechniques**, v. 6, p. 730-735, 1994.

BRUNEL, L.; NEUGNOT, V.; LANDUCCI, L.; BOZE, H.; MOULIN, G.; BIGEY, F.; DUBREUCQ, E. High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 111, p. 41-50, 2004.

BUCHERT, J.; SALMINEN, J.; SIIKA-AHO, M.; RANUA, M.; VIIKARI, L. The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching. **Holzforschung**, v. 47, p. 473-478, 1993.

BUCKHOLZ, F. G.; GLEESON, M. A. G. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. **Biotechnology**, v. 9, p. 1067-1072, 1991.

CAI, H.; SHI, P.; LUO, H.; BAI, Y.; HUANG, H.; YANG, P.; YAO, B. Acidic  $\beta$ -mannanase from *Penicillium pinophilum* C1: Cloning, characterization and assessment of its potential for animal feed application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 112, n. 6, p. 551-557, 2011.

CAVACO-PAULO, A. Mechanism of cellulase action in textile processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 273-277, 1998.

CEREGHINO, G. P.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 329-332, 2002.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 45-66, 2000.

CETESB, Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Água do Mar: teste de toxicidade aguda com *Artemia***. São Paulo, 1987.

- CHA, J. Y.; NARISA, D.; LUECHAI, S.; SAOVANEE C. DHARMSTHITI, S. C. Multiple non-polysaccharide-degrading enzyme production from solid state fermentation of *Aspergillus niger* AK10. **Asian Journal of Food and Agro-Industry**, v. 3, n. 01, p. 108-119, 2010.
- CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 18, p. 295-331, 1998.
- CHANG, D. C.; CHASSY, B. M.; SAUNDERS, J. A.; SOWERS, A. E. **Guide to electroporation and electrofusion**. San Diego: Academic Press, Inc., 1992.
- CHANG, M. C. Harnessing energy from plant biomass. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 11, n. 6, p. 677-684, 2007.
- CHEN, X.; CAO, Y.; DING, Y.; LU, W.; LI, D. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus*  $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 452-461, 2007.
- CHERYAN, M. **Ultrafiltration and Microfiltration Handbook**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company Inc., 1998.
- CHISTI, Y. **Airlift Bioreactors**. London: Elsevier Applied Science, 1989.
- CHRISTGAU, S.; KOFOD, L.V.; ANDERSEN, L.N.; KAUPPINEN, S.; HELDIHANSEN, H.P.; DALBOEGE, H. **An enzyme exhibiting mannanase activity**. WO 94/25576, 1994.
- CHUNG, B. K.; SELVARASU, S.; ANDREA, C.; RYU, J.; LEE, H.; AHN, J.; LEE, H.; LEE, D-H. Genome-scale metabolic reconstruction and in silico analysis of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for strain improvement. **Microbial Cell Factories**, v.9, p. 50, 2010.
- COLAO, M. C.; LUPINO, S.; GARZILLO, A. M.; BUONOCORE, V.; RUZZI, M. Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Microbial Cell Factories**, v. 5, p. 31-41, 2006.
- COMPAGNO, C.; TURA, A.; RANZI, B.M.; ALBERGHINA, L.; MARTEGANI, E. Copy number modulation in an autoselection system for stable plasmid maintenance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v. 9, n. 6, p. 594–599, 1993.
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 14/02/2015.
- COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Petrópolis: Epub, 2008.

COLACINO, F.; CRICHTON, R. R. Enzyme thermostabilization: the State of Art. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, n. 14, p. 211-277, 1997.

COSTA, S. A.; TZANOV, T.; CARNEIRO, A. F.; PAAR, A.; GÜBITZ, G. M.; CAVACO-PAULO, A. Studies of stabilization of native catalase using additives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 387-391, 2002.

CRAVCHIK A.; MATUS A. A novel strategy for the immunological tagging of cDNA constructs. **Gene**, v. 137, p. 139-143, 1993.

CREGG, J. M.; BARRINGER, K. J.; HESSLER, A. Y.; MADDEN, K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 3376-3385, 1985.

CREGG, J. M.; VEDVICK, T. S.; RASCHKE, W. C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. **Biotechnology**, v. 11, 905-910, 1993.

CREGG, J.M.; TOLSTORUKOV, I.; KUSARI, A.; SUNGA, J.; MADDEN, K.; CHAPPELL, T. Expression in the yeast *Pichia pastoris*. In: BURGESS, R. R.; MURRAY, P. D. **Methods in Enzymology v. 463 - Guide to protein purification**. 2. ed., 2009. p. 169-89.

CRVAB. Disponível em: <<http://www.crvab.com/english/ShowProducts.asp?id=44>>. Acesso em: 27/03/2015.

CUNNINGHAM, T.M.; WALKER, E.M.; MILLER, J.N.; LOVETT, M. A. Selective release of *Treponema pallidum* outer membrane and associated polypeptides with triton x-114. **Journal of Bacteriology**, v. 170, p. 5789-5796, 1988.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P.; OLIVER, S. G. Fed-batch methanol feeding strategy for recombinant protein production by *Pichia pastoris* in the presence of co-substrate sorbitol. **Yeast**, v. 26, p. 473-484, 2009.

ÇELİK, E.; ÇALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1108-1118, 2012.

DAKO, E.; BERNIER, A. M.; DADIE, A. T.; JANKOWSKI, C. K. **The Problems Associated with Enzyme Purification**, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/chemical-biology/the-problems-associated-withenzyme-Purification>>. Acesso em: 09/02/2015.

DALBØGE, H.; HELDT-HANSEN, H. A novel method for efficient expression cloning of fungal enzyme genes. **Molecular and General Genetics**, p. 253-260, 1994.

DALBØGE, H. Expression cloning of fungal enzymes genes; a novel approach for efficient isolation of enzymes genes of industrial relevance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p. 29-42, 1997.

DASKIRAN, M.; TEETER, R. G.; FODGE, D. W., HSIAO, H.Y. An evaluation of endo- $\beta$ -mannanase (Hemicell) effects on broiler performance and energy use in diets varying in  $\beta$ -mannan content. **Poultry Science**, v. 83, p. 662-668, 2004.

DJEKRIF-DAKHMOCHE, S.; GHERIBI-AOULMI, Z.; MERAIHI, Z.; BENNAMOUN, L. J. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for  $\alpha$ -amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. **Food Engineering**, v. 73, p. 190-197, 2006.

DORAN, P. **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press, 1995.

DOYLE, J. P.; GIANNOULI, P.; MARTIN, E. J.; BROOKS, M.; MORRIS, E. R. Effect of sugars, galactose content and chainlength on freeze–thaw gelation of galactomannans. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, p. 391-401, 2006.

DRAGOSITS, M.; STADLMANN, J.; ALBIOL, J.; BAUMANN, K.; MAURER, M.; GASSER, B.; SAUER, M.; ALTMANN, F.; FERRER, P.; MATTANOVICH, D. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. **Journal of Proteome Research**, v. 8, p. 1380-1392, 2009.

DUPONT. **Genencor launches mannanase enzyme targeted to remove tough guar gums from fabrics**, 2003. Disponível em: <<http://biosciences.dupont.com/media/news-archive/news/2003/genencor-launches-mannanase-enzyme-targeted-to-remove-tough-guar-gums-from-fabrics/>>. Acesso em: 27/03/2015.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 3639, p. 1-13, 2002.

ECONOMOU, C.N.; MAKRI, A.; AGGELIS, G.; PAVLOU, S.; VAYENAS, D.V. Semi-solid state fermentation of sweet sorghum for the biotechnological production of single cell oil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1385-1388, 2010.

ELANCO. **Hemicell®: The energy-sparing enzyme**, 2012. Disponível em: <[https://www.elanco.us/pdfs/ussbuhem00001\\_hemicell\\_faq\\_detailer\\_pbu.pdf](https://www.elanco.us/pdfs/ussbuhem00001_hemicell_faq_detailer_pbu.pdf)>. Acesso em: 10/05/2015.

ELANCO. Disponível em: <<http://www.elanco.us/productservices/poultry/hemicell.aspx>>. Acesso em: 27/03/2015.

EL-HELOW, E. R.; SABRY, S. A.; KHATTAB, A. A. Production of  $\beta$ -mannanase by *B. subtilis* from agro-industrial by-products: screening and optimization. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 71, p. 189-193, 1997.

EMBRAPA SOJA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Soja em números**, 2015. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/sojaemnumeros/>>. Acesso em: 08/01/2015.

ENZYME SOLUTIONS. Disponível em:

<<http://www.enzymesolutions.com.au/catalogue/4457/cleaning.html>>. Acesso em: 27/03/2015.

EUN, J. S.; BEAUCHEMIN, K. A.; HONG, S. H.; BAUER, M. W. Exogenous enzymes added to untreated or ammoniated rice straw: effects on in vitro fermentation characteristics and degradability. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 87–102, 2006.

FDA - Food and Drug Administration. **Guidance for Industry ANDAs: Stability Testing of Drug Substances and Products**, 2013. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm320590.pdf>>. Acesso em: 03/11/2015.

FENG, P.; HE, Z.; ONG, S. L.; HU, J.; ZHANG, Z.; NG, W. J. Optimization of agitation, aeration, and temperature conditions for maximum  $\beta$ -mannanase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 282-289, 2003.

FOGEL, S.; WELCH, J. W. Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, p. 5342-5346, 1982.

FRANCESCONI, A.; KASAI, M.; HARRINGTON, S. M.; BEVERIDGE, M. G.; PETRAITIENE, R.; PETRAITIS, V.; SCHAUFLELE, R. L.; WALSH, T.J. Automated and manual methods of DNA extraction for *Aspergillus fumigatus* and *Rhizopus oryzae* analyzed by quantitative real time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 1978–1984, 2008.

FU, D.; LI, C.; LU, J.; RAHMAN, A.; TAN, T. Relationship between thermal inactivation and conformational change of *Yarrowia lipolytica* lipase and the effect of additives on enzyme stability. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 136-141, 2010.

GALATI, R. L.; EZEQUIEL, J. M. B.; SILVA, O. G. C.; SANTOS, V. C.; FONTES, N. A.; BARBOSA, J. P. In: ZOOTEC. **Co-produtos do milho e soja para bovinos de corte - Digestibilidades parciais e total**. Brasília: Faculdades Upis, 2004.

GASSER, B.; SALOHEIMO, M.; RINAS, U.; DRAGOSITS, M.; RODRIGUEZ-CARMONA, E.; BAUMANN, K.; GIULIANI, M.; PARRILLI, E.; BRANDUARDI, P.; LANG, C.; PORRO, D.; FERRER, P.; TUTINO, M. L.; MATTANOVICH, D.; VILLAVERDE, A. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview. **Microbial Cell Factories**, v. 7, p. 11, 2008.

GE HEALTHCARE, 2008. Disponível em:

<[https://www.gelifesciences.com/gehcls\\_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28933585\\_20150413221957.pdf](https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28933585_20150413221957.pdf)> Acesso em: 20/01/2014.

GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 177, p. 437-447, 2003.

GELLISSEN, G.; STRASSER, A. W. M.; SUCKOW, M. Key and criteria to the selection of an expression platform. In: GELLISSEN, G. **Production of recombinant proteins — novel microbial and eukaryotic expression systems**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005. p. 1-5.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GONÇALVES, A. R.; ESPOSITO, E.; BENAR, P. Evaluation of *Panus tigrinus* in the delignification of sugarcane bagasse by FTIR-PCA and pulp properties. **Journal of Biotechnology**, v. 66, p. 177-185, 1998.

GUENTER, W. **Practical experience with the use of enzymes**, 1997. Disponível em: <[http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=LcaZ7b6UKWcC&oi=fnd&pg=PA53&dq=Practical+experience+with+the+use+of+enzymes.&ots=URVkwERLN9&sig=ubYUIzFH6uxTt\\_N4OvXFt4Vknvc#v=onepage&q=Practical%20experience%20with%20the%20use%20of%20enzymes.&f=false](http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=LcaZ7b6UKWcC&oi=fnd&pg=PA53&dq=Practical+experience+with+the+use+of+enzymes.&ots=URVkwERLN9&sig=ubYUIzFH6uxTt_N4OvXFt4Vknvc#v=onepage&q=Practical%20experience%20with%20the%20use%20of%20enzymes.&f=false)>. Acesso em: 03/10/2011.

GRAMINHA, E. B. N.; GONÇALVES, A. Z. L.; PIROTA, R. D. P. B.; BALSALOBRE, M. A. A.; SILVA, R.; GOMES, E. Enzyme production by solid-state fermentation: Application to animal nutrition. **Animal Feed Science and Technology**, v. 144, p. 1-22, 2008.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

GRIFFIN, D. W.; KELLOGG, C. A.; PEAK, K. K.; SHINN, E. A. A rapid and efficient assay for extracting DNA from fungi. **Letters Applied in Microbiology**, v. 34, p. 210-214, 2002.

GRITZ, L.; DAVIES, J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance — the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v. 25, p. 179-188, 1983.

GÜBITZ, G. M.; SCHNITZHOFFER, W.; BALAKRISHNAN, H.; STEINER, W. Two mannanases from *Sclerotium rolfsii* in total chlorine free bleaching of softwood kraft pulp. **Journal of Biotechnology**, v. 50, p. 181-188, 1996.

GULLA, K. C.; GOUDA, M. D.; THAKUR, M. S.; KARANTH, N. G. Enhancement of stability of immobilized glucose oxidase by modification of free thiols generated by reducing disulfide bonds and using additives. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 19, p. 621-625, 2004.

HABIO ENZYME. Disponível em: <<http://www.habio.net/product.php?id=16>>. Acesso em: 27/03/2015.

HADFIELD, C.; RAINA, K. K.; SHASHI-MENON, K.; MOUNT, R. C. The expression and performance of cloned genes in yeasts. **Mycological Research**, v. 97, n. 8, p. 897-944, 1993.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.

HARRIS, E. L. V.; ANGAL, S. **Protein purification methods: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1989.

HE, X.; LIU, N.; LI, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, B.; MA, Y. Inducible and constitutive expression of a novel thermostable alkaline  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 13-18, 2008.

HECK, J. X.; SOARES, L. H. B.; AYUB, M. A. Z. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL53 on solid-state cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, p. 417-423, 2005.

HENRISSAT, B.; BAIROCH, A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **Biochemical Journal**, v. 293, p. 781-788, 1993.

HIGGINS, D. R.; CREGG, J. M. Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods in Molecular Biology**, v. 103, p. 1-15, 1998.

HOLKER, U.; HOFER, M.; LENZ, J. Biotechnological advantages of laboratory-scale solid state fermentation with fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p. 175-186, 2004.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline Quality of Biotechnological Products: Stability Testing of Biotechnological/Biological Products Q5C**, 1995. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q5C/Step4/Q5C_Guideline.pdf)>. Acesso em 04/11/2014.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **ICH Harmonised Tripartite Guideline: Stability testing of new drug substances and products Q1A (R2)**, 2003. Disponível em: <[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q1A\\_R2/Step4/Q1A\\_R2\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf)>. Acesso em: 04/11/2014.

ICH - International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Disponível em: <[www.ich.org](http://www.ich.org)>. Acesso em: 03/11/2014.

IMAGE GALLERY GATEWAY. **Genomic Science Image Gallery**, 2012. Disponível em: <<https://public.ornl.gov/site/gallery/gallery.cfm?topic=53&restsection=public>>. Acesso em: 05/06/2012.

INAN, M.; CHIRUVOLU, V.; ESKRIDGE, K. M.; VLASUK, G. P.; DICKERSON, K. BROWN, S.; MEAGHER, M. M. Optimization of temperature–glycerol–pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 438-445, 1999.

INAN, M.; MEAGHER, M. M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p. 585-589, 2001.

IORIO, F. F.; DI STASI, C. A.; BORGES, F. S. Eletroporação: uma revisão. **Revista Fisioterapia Ser**, n. 2, p. 1-10, 2007.

JIANG, Z.; WEI, Y.; LI, D.; LI, L.; CHAI, P.; KUSAKABE, I. High-level production, purification and characterization of a thermostable  $\beta$ -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 88–96, 2006.

JIMENEZ A, DAVIES J. Expression of a transposable antibiotic-resistance element in *Saccharomyces*. **Nature**, v. 287, p. 869-871, 1980.

JOHNSON, M. A.; WATERHAM, H. R.; KSHEMINSKA, G. P.; FAYURA, L. R.; CEREGHINO, J. L.; STASYK, O.V.; VEENHUIS, M.; KULACHKOVSKY, A. R.; SIBIRNY, A. A.; CREGG, J. M. Positive selection of novel peroxisome biogenesis-defective mutants of the yeast *Pichia pastoris*. **Genetics**, v. 151, p. 1379-1391, 1999.

JØRGENSEN, H.; ERIKSSON, T. BÖRJESSON, J.; TJERNELD, F.; OLSSON, L. Purification and characterization of five cellulases and one xylanase from *Penicillium brasilianum* IBT 20888. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 851-861, 2003.

KANTARCIA, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263-2283, 2005.

KATROLIA, P.; ZHOU, P.; ZHANG, P.; YAN, Q.; LI, Y.; JIANG, Z.; XU, H. High level expression of a novel  $\beta$ -mannanase from *Chaetomium* sp. Exhibiting efficient mannan hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 480-490, 2012.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr., A. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.2. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 493-522.

KIM, D.Y.; HAM, S. J.; LEE, H.J.; CHO, H. Y.; KIM, J. H.; KIM, Y. J.; SHIN, D. H. RHEE, Y. H.; SON, K. H.; PARK, H. Y. Cloning and characterization of a modular GH5  $\beta$ -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 9185-9192, 2011.

KIRK, O.; BORCHER, T. V.; FUGLSANG, C. C. Industrial enzyme applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 345–351, 2002.

KUMAR, P. K. R.; LONSANE, B. K. Microbial production of gibberellins: State of the Art. **Advances in Applied Microbiology**, v. 34, p. 29-139, 1989.

KUMAR, R.; SINGH, R. P. Semi-solid-state fermentation of *Eicchornia crassipes* biomass as lignocellulosic biopolymer for cellulase and  $\beta$ -glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus niger* RK3 and *Trichoderma reesei* MTCC164. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 96, p. 71-82, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LA GRANGE, D. C.; PRETORIUS, I.S.; VAN ZYL, W. H. Expression of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylanase gene (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 1036-1044, 1996.

LEITE, G. M.; MAGAN, N.; MEDINA, A. Comparison of different bead-beating RNA extraction strategies: An optimized method for filamentous fungi. **Journal of Microbiological Methods**, v. 88, p. 413-418, 2012.

LIFE TECHNOLOGIES. **pPICZ $\alpha$  A, B and C - User Manual Cat. N $^{\circ}$  V195-20**, 2010. Disponível em: <[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf)>. Acesso em: 09/10/2013.

LIFE TECHNOLOGIES. **User Guide Pichia Expression Cat. N $^{\circ}$  K1710-01**, 2014. Disponível em: <[http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich\\_man.pdf](http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf)>. Acesso em: 30/05/2014.

LI, P.; ANUMANTHAN, A.; GAO, X. G.; ILANGOVAN, K.; SUZARA, V. V.; DÜZGÜNEŞ, N.; RENUGOPALAKRISHNAN, V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 142, p. 105-124, 2007.

LI, Y.; CHEN, X.; CHEN, Y.; LI, Z.; CAO, Y. Effects of  $\beta$ -mannanase expressed by *Pichia pastoris* in corn–soybean meal diets on broiler performance, nutrient digestibility, energy utilization and immunoglobulin levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 159, p. 59-67, 2010.

LI, J. F.; ZHAO, S. G.; TANG, C. D.; WANG, J. Q.; WU, M. C. Cloning and functional expression of an acidophilic  $\beta$ -mannanase gene (*Anman5A*) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 765-773, 2012.

LIN-CEREGHINO, G. P.; SUNGA, A. J.; LIN CEREGHINO, J.; CREGG, J. M. Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genetic Engineering**, v. 23, p. 157-169, 2001.

LIN, T.; CHEN, C. Enhanced mannanase production by submerged culture of *Aspergillus niger* NCH-189 using defatted copra based media. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1103-1109, 2004.

LIU, Z.; QI, W.; WU, W.; LIU, Y.; HE, Z. Enhancing thermostability of  $\beta$ -mannanase by protective additives. **Frontiers of Chemical Engineering in China**, v. 2, n. 4, p. 439-442, 2008.

LUCAS, T. I.; BISHARA, R. H.; SEEVERS, R. H. A stability program for the distribution of drug products. **Pharmaceutical Technology**, v. 2, p. 68-73, 2004.

LUO, H.P.; AL-DAHMAN, M.H. Macro-mixing in draft-tube airlift bioreactor. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 1572-1585, 2008.

LUO, H. Y.; WANG, Y. R.; WANG, H.; YANG, J.; YANG, Y. H.; HUANG, H. Q.; YANG, P. L.; BAI, Y. G.; SHI, P. J.; FAN, Y. L.; YAO, B. A novel highly acidic  $\beta$ -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: Gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 453-461, 2009.

MACHADO, C. M. M. **Desenvolvimento de bioprocesso para produção de hormônio vegetal (ácido giberélico – ga3) por fermentação no estado sólido em resíduos agroindustriais brasileiros: relação da produção de ga3 em biorreator piloto e bioensaios em mudas de tomateiro (*Lycopersiicum esculentum*)**. Tese de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2002. 95 p.

MACHADO, I. TEIXEIRA, J. A.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Semi-solid-state fermentation: A promising alternative for neomycin production by the actinomycete *Streptomyces fradiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 165, p. 195-200, 2013.

MAGALHÃES, P. O.; MILAGRES, A. M. F. Biochemical properties of a  $\beta$ -mannanase and a  $\beta$ -xylanase produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 191-195, 2009.

MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 715-721, 2002.

MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2331-2350, 2010.

MALDONADO, M. C.; STRASSER DE SAAD, A. M. (1998) Production of pectinase and polygalactouronase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 20:34-38.

MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. **Process Biochemistry**, v. 13, n. 5, 1978.

MARTIN, J. W.; DAVIS, G.E. An updated classification of the recent Crustacea. **Natural History Museum of Los Angeles County - Science Series**, v. 39, p. 1-124, 2001.

MARTZEN, M. R.; MC CRAITH, S. M.; SPINELLI, S. L.; TORRES, F. M.; FIELDS, S.; GRAYHACK, E. J.; PHIZICKY, E. M. A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. **Science**, v. 286, p. 1153-1155, 1999.

MAYORGA, P.; PÉREZ, K. R.; CRUZ, S. M.; CÁCERES, A. Comparison of bioassays using the anostracan crustaceans *Artemia salina* and *Thamnocephalus platyurus* for plant extract toxicity screening. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, 2010.

MEDDIC, 2014. Disponível em: <[http://meddic.jp/Pichia\\_pastoris](http://meddic.jp/Pichia_pastoris)> Acesso em: 22/11/2014.

MHRA - Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. **Regulation Medicines and Medical Devices**, 2012. Disponível em: <<http://www.mhra.gov.uk/home/groups/commsic/documents/websiteresources/con2031677.pdf>>. Acesso em: 04/11/2014.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MITCHELL, D. A.; VON MEIEN, O. F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v.13, p. 137-147, 2003.

MOHAMAD, S. N.; RAMANAN, R. N.; MOHAMAD, R.; ARIFF, A. B. Improved mannan-degrading enzymes' production by *Aspergillus niger* through medium optimization. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 146-152, 2011.

MONTESINO, R.; NIMTZ, M.; QUINTERO, O.; GARCIA, R.; FALCON, V.; CREMATA, J. A. Characterization of the oligosaccharides assembled on the *Pichia pastoris* expressed recombinant aspartic protease. **Glycobiology**, v. 9, p. 1037-1043, 1999.

MOREIRA, L. R. S.; FILHO, E. X. F. An overview of mannan structure and mannan degrading enzyme systems. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 165-178, 2008.

MOZHAEV, V. V.; MARTINEK, K. Structure-stability relationships in proteins: new approaches to stabilizing enzymes. **Enzyme Microbial Technology**, v. 6, p. 50-59, 1984.

NETO, J. B. Purificação de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 377-390.

NICOLAS, P.; RAETZ, E.; REYMOND, S.; SAUVEGEAT, J. L. **Hydrolysis of the galactomannans of coffee extract with immobilized  $\beta$ -mannanase**. US 5714183, 1998.

NUNES, F. M.; COIMBRA, M. A. Influence of polysaccharide composition in foam stability of espresso coffee. **Carbohydrate Polymers**, v. 37, p. 283-285, 1998.

OLIVEIRA, J. **Produção de ácido giberélico por fermentação submersa e por fermentação no estado semissólido em diferentes modelos de biorreatores utilizando polpa cítrica**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Paraná, 2012. 129 p.

OOI, T.; KIKUCHI, D. Purification and some properties of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus* sp. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 310-314, 1995.

OSMA, J. F.; MOILANEN, U.; TOCA-HERRERA, J. L.; RODRÍGUEZ-COUTO, S. Morphology and laccase production of white-rot fungi grown on wheat bran flakes under semi-solid-state fermentation conditions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 318, p. 27-34, 2011.

OZTURK, B.; CEKMECELIOGLU, D.; OGEL, Z. B. Optimal conditions for enhanced  $\beta$ -mannanase production by recombinant *Aspergillus sojae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, p. 135-139, 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. General and fundamental aspects of SSF - Introduction. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. New Delhi: Springer, 2008. p. 3.

PAPAGIANNI, M.; NOKES, S.E.; FILEK, K. Submerged and solid-state phytase fermentation by *Aspergillus niger*: Effects of agitation and medium viscosity on phytase production, fungal morphology and inoculum performance. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 319-326, 2001.

PEL, H. J.; DE WINDE, J.H.; ARCHER, D. B.; DYER, P. S.; HOFMANN, G.; SCHAAP, P. J.; TURNER, G.; DE VRIES, R. P.; ALBANG, R.; ALBERMANN, K.; ANDERSEN, M. R.; BENDTSEN, J. D.; BENEN, J. A.; VAN DEN BERG M.; BREESTRAAT, S.; CADDICK, M. X.; CONTRERAS, R.; CORNELL, M.; COUTINHO, P. M.; DANCHIN, E. G.; DEBETS, A. J.; DEKKER, P. VAN DIJCK, P. W.; VAN DIJK, A.; DIJKHUIZEN, L.; DRIESSEN, A. J.; D'ENFERT, C.; GEYSENS, S.; GOOSEN, C.; GROOT, G. S.; DE GROOT, P. W.; GUILLEMETTE, T.; HENRISSAT, B.; HERWEIJER, M.; VAN DEN HOMBERGH, J. P.; VAN DEN HONDEL, C. A.; VAN DER HEIJDEN, R. T.; VAN DER KAAIJ, R. M.; KLIS, F. M.; KOOLS, H. J.; KUBICEK, C. P.; VAN KUYK, P. A.; LAUBER, J.; LU, X.; VAN DER MAAREL, M. J.; MEULENBERG, R.; MENKE, H.; MORTIMER, M. A.; NIELSEN, J.; OLIVER, S. G.; OLSTHOORN, M.; PAL, K.; VAN PEIJ, N. N.; RAM, A. F.; RINAS, U.; ROUBOS, J. A.; SAGT, C. M.; SCHMOLL, M.; SUN, J.; USSERY, D.; VARGA, J.; VERVECKEN, W.; VAN DE VONDERVOORT, P. J.; WEDLER, H.; WÖSTEN, H. A.; ZENG, A. P.; VAN Ooyen, A. J.; VISSER, J.; STAM, H. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 221-231, 2007.

PENG, S.Y.; NORMAN, J.; CURTIN, G.; CORRIER, D.; MCDANIEL, H. R.; BUSBEE, D. Decreased mortality in *Norman murine* sarcoma in mice treated with the immunomodular, acemannan. **Molecular biotherapy**, v. 3, p. 79-87, 1991.

PETERSEN, E.; MARGARITIS, A. Hydrodynamic and mass transfer characteristics of three-phase gaslift bioreactor systems. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 21, p. 233-294, 2001.

PFEIFER, T. A.; HEGEDUS, D. D.; GRIGLIATTI, T. A.; THEILMANN, D. A. Baculovirus immediate-early promoter-mediated expression of the Zeocin (TM) resistance gene for use as a dominant selectable marker in Dipteran and Lepidopteran insect cell lines. **Gene**, v. 188, p. 183-190, 1997.

PHAM, T. A.; BERRIN, J. G.; RECORD, E.; TO, K. A.; SIGOILLOT, J. C. Hydrolysis of softwood by *Aspergillus* mannanase: Role of a carbohydrate-binding module. **Journal of Biotechnology**, v. 148, p. 163–170, 2010.

PIMENTEL, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. C. G.; SANTAELLA, S. T.; LOTUFO, L. V. C. O uso de *Artemia* sp. como organismo-teste para avaliação da toxicidade das águas residuárias do beneficiamento da castanha de caju antes e após tratamento em reator biológico experimental. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 15-22, 2011.

PUCHART, V.; VRŠANSKÁ, M.; SVOBODA, P.; POHL, J.; ÖGEL, Z. B.; BIELY, P. Purification and characterization of two forms of endo- $\beta$ -1,4-mannanase from a thermotolerant fungus, *Aspergillus fumigatus* IMI 385708 (formerly *Thermomyces lanuginosus* IMI 158749). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1674, p. 239-250, 2004.

QIAGEN. **QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit Quick-Start Protocol**, 2011. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=7276b2a6-aa15-4a83-b380-073ffbc2afe&lang=en>>. Acesso em: 17/10/2013.

QIAGEN. **RNeasy® Mini Handbook Fourth Edition**, 2012. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>>. Acesso em: 17/10/2013.

QIAGEN. **QIAGEN® Plasmid Purification Handbook**, 2012b. Disponível em: <<https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=46205595-0440-459e-9d93-50eb02e5707e&lang=en>>. Acesso em: 20/04/2014.

RAMON, R.; FERRER, P.; VALERO, F. Sorbitol co-feeding reduces metabolic burden caused by the overexpression of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **Journal of Biotechnology**, v. 130, p. 39-46, 2007.

RÄTTÖ, M.; POUTANEN, K. Production of mannan-degrading enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 10, p. 661-664, 1988.

REYNOLDS, D. W.; FACCHINE, K. L.; MULLANEY, F. J.; ALSANTE, K. M. HATAJIK, T. D.; MICHEL, M. G. Available guidance and best practices for conducting forced degradation studies. **Pharmaceutical Technology**, v. 26, n. 2, p. 48-56, 2002.

RODRIGUES, C.; SOCCOL, C. R. **Tecnologia Enzimática**. Curitiba: SENAI, 2009.

RODRÍGUEZ, C.S.; SANTORO, R.; CAMESELLE, C.; SANROMÁN, A. Laccase production in semi-solid cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 10, p. 995-998, 1997.

RODRÍGUEZ, E.; MULLANEY, E.; LEI, X. Expression of the *Aspergillus fumigatus* phytase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.268, p. 324-331, 2000.

RODRIGUEZ, E.; WOOD, Z. A.; KARPLUS, P. A.; LEI, X. G. Site-directed mutagenesis improves catalytic efficiency and thermostability of *Escherichia coli* pH 2.5 acid phosphatase/phytase expressed in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 382, p. 105-112, 2000.

RODRÍGUEZ COUTO, S.; DOMÍNGUEZ, A. SANROMÁN, A. Utilisation of lignocellulosic wastes for lignin peroxidase production by semi-solid-state cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Biodegradation**, v. 12, p. 283-289, 2001.

ROMANOS, M. A.; SCORER, C. A.; CLARE, J. J. Foreign gene expression in yeast: A review. **Yeast**, v. 8, p. 423-488, 1992.

ROTH, R.; MOODLEY, V.; VAN ZYL, P. Heterologous expression and optimized production of an *Aspergillus aculeatus* endo-1,4- $\beta$ -mannanase in *Yarrowia lipolytica*. **Molecular Biotechnology**, v. 43, p. 112-120, 2009.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6. ed. Washington: Pharmaceutical Press, 2009.

SAGT, C. M.; KLEIZEN, B.; VERWAAL, R.; DE JONG, M. D.; MULLER, W. H., SMITS, A. Introduction of an N-glycosylation site increases secretion of heterologous proteins in yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4940-4944, 2000.

SALMON, D. N. X. **Desenvolvimento de um bioprocesso para a produção, recuperação e formulação de fitase de *Ganoderma* sp. MR-56 obtida por cultivo submerso**. Tese de Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. Universidade Federal do Paraná, 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANT'ANNA JR, G. L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**, v.3. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

SÁ-PEREIRA, P.; PAVEIA, H.; COSTA-FERREIRA, M.; AIRES-BARROS, M. R. A new look at xylanases: An overview of purification strategies. **Molecular Biotechnology**, v. 24, p. 257-281, 2003.

SARROUH, B. F.; SANTOS, J. C.; CUNHA, M. A. A.; BRANCO, R. F. Potential biomass resources for cellulosic ethanol production in Brazil: Availability, feedstock analysis, feedstock composition and conversion yields. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. **Biofuels in Brazil, fundamental aspects, recent developments and future perspectives**. Switzerland: Springer, 2014.

SCHÄFER, T.; KIRK, O.; BORCHERT, T. V.; FUGLSANG, C. C.; PEDERSEN, S.; SALMON, S.; OLSEN, H. S.; DEINHAMMER, R.; LUND, H. **Enzymes for Technical Applications**. Disponível em: <[http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf\\_v07/vol07\\_04.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v07/vol07_04.pdf)>. Acesso em: 11/11/2014.

SCHEUER, T. **Development of a recombinant component for acellular pertussis vaccine DTaP**. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, 2013. 51 p.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda, v. 2, 2001.

SCHUSTER, E.; DUNN-COLEMAN, N.; FRISVAD, J. C.; VAN DIJCK, P. W. M. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 426–435, 2002.

SEARS, I. B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O. W.; GLICK, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 14, p. 783-790, 1998.

SERMANI, G. G.; TISO, N. Aspects of design of bioreactors in SSF. In: PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. **Current developments in solid-state fermentation**. 1 ed. New Delhi: Springer, 2008. p. 117-144.

SETATI, M. E.; ADEMARK, P.; VAN ZYL, W. H.; HAHN-HÄGERDAL, B., STÅLBRAND, H. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- $\beta$ -1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 105-114, 2001.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 219-228, 2003.

SHEEHAN, J.; HIMMEL, M. E. Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the U.S. Department of Energy's research and Development activities for ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 817-827, 1999.

SHEN, S.; SULTER, G.; JEFFRIES, T. W.; CREGG, J. M. A strong nitrogen source regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Gene**, v. 216, p. 93-102, 1998.

SIBIRNY, A. A.; UBIYVOVK, V. M.; GONCHAR, M. V.; TITORENKO, V. I.; VORONOVSKY, A. Y.; KAPULTSEVICH, Y. G.; BLIZNIK, K. M. Reaction of direct formaldehyde oxidation to CO<sub>2</sub> are not essential for energy supply of yeast methylotropic growth. **Archives Microbiology**, v. 154, p. 566-575, 1990.

SIGMA-ALDRICH. **Sucrose p.a. (Vetec)**, 2015. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search?interface=All&term=sucrose&N=0+4294602229&mode=match+partialmax&focus=product&lang=pt&region=BR>>. Acesso em: 17/01/2015.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, p. 661-667, 2009a.

SILVA, K. E. R.; ALVES, L. D. S.; SOARES, M. F. R.; PASSOS, R. C. S.; FARIA, A. R.; ROLIM NETO, P. J. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 2, p. 1-8, 2009b.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P. PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). **Planta Medica**, v. 59, p. 250-252, 1993.

SONI, H.; GANAIE, M. A.; PRANAW, K.; KANGO, N. **Design-of-experiment strategy for the production of mannanase biocatalysts using palm kernel cake and its application to degrade locust bean and guar gum**. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, aceite para publicação.

SONG, J. M.; NAM, K. W.; KANG, S. G.; KIM, C. G.; KWON, S.T.; LEE, Y. H. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active  $\beta$ -1,4-D-mannanase from the Antarctic springtail, *Cryptopygus antarcticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, v. 151, p. 32-40, 2008.

SOUSA, E. C. P. M. Toxicologia marinha: histórico. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria, 2002. p. 9-12.

SRIVASTAVA, P. K.; KAPOOR, M. Extracellular endo-mannanase from *Bacillus* sp. CFR1601: Economical production using response surface methodology and downstream processing using aqueous two phase system. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 672-681, 2013.

STÅLBRAND, H.; SALOHEIMO, A.; VEHMAANPERÄ, J.; HERISSAT, B.; PENTTILÄ, M. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* b-mannanase gene containing a cellulose binding domain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 3, p. 1090-1097, 1995.

ST-PIERRE, D. Disponível em: <<http://www.inspq.qc.ca/english/mouldcompendium/aspergillus-niger>>. Acesso em: 22/11/2014.

SUBRAMANIYAM, R.; VIMALA, R. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. **International Journal of Science and Nature**, v. 3, n. 3, p. 480-486, 2012.

SUSANTO, H.; ULBRICHT, M. Characteristics, performance and stability of polyethersulfone ultrafiltration membranes prepared by phase separation method using different macromolecular additives. **Journal of Membrane Science**, v. 327, p. 125-135, 2009.

SUURNÄKKI, A.; CLARK, T.A.; ALLISON, R.W.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. Mannanase-aided bleaching of softwood kraft pulps. In: SREBOTNIK, E.; MESSNER, K. **Biotechnology in the pulp and paper industry: recent advances in applied and fundamental research**. Vienna: Facultas-Universitätsverlag, 1996. p. 69-74.

SUURINAKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; VIIKARI, L. Hemicellulases in the bleaching of chemical pulps. In: SCHEPER, T. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 262-284.

TECHAPUN, C.; NAIYATAT, P.; WATANABE, M.; SASAKI, K. Optimization of aeration and agitation rates to improve cellulase-free xylanase production by thermotolerant *Streptomyces* sp. Ab 106 and repeated fed-batch cultivation using agricultural waste. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 3, p. 298-301, 2003.

TOMOTARI, M. Bifidobacteria and their role in human health. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 6, p. 263-268, 1990.

TRIMBLE, R. B.; ATKINSON, P. H.; TSCHOPP, J. F.; TOWNSEND, R. R.; MALEY, F. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 22807-22817, 1991.

TSANG, A.; BUTLER, G.; POWLOWSKI, J.; PANISKO, E. A.; BAKER, S. E. Analytical and computational approaches to define the *Aspergillus niger* secretome. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p.153-160, 2009.

TSCHOPP, J. F.; SVERLOW, G.; KOSSON, R.; CRAIG, W., GRINNA, L. High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. **Nature Biotechnology**, v. 5, p. 1305-1308, 1987.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R. Expression of the lacZ gene from 2 methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. **Nucleic Acids Research**, v.15, p. 3859–3876, 1987.

TULL, D.; GOTTSCHALK, T. E.; SVENDSEN, I.; KRAMHOFT, B.; PHILLIPSON, B. A.; BISGARD-FRANTZEN, H.; OLSEN, O.; SVENSSON, B. Extensive N-glycosylation reduces the thermal stability of a recombinant alkalophilic bacillus

alpha-amylase produced in *Pichia pastoris*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 13-23, 2001.

University of Adelaide, 2014. Disponível em: <[http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/hyaline\\_moulds/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/gallery/hyaline_moulds/)>. Acesso em: 22/11/2014.

USEPA. Trimmed spearman-karber (TSK) program version 1.5 ecological monitoring research division. **Environmental Monitoring Systems Laboratory**. Cincinnati, 1990.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Z. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 338-344, 2002.

VANDENBERGHE, L. P. S., SOCCOL, C. R., WEINGARTNER, V., SPIER, M. R., SCHEUER, T. **Processo para a produção microbiana de mananases utilizando resíduos/subprodutos**. PI06879354, 2012.

VAN DEN STEEN, P.; RUDD, P. M.; PROOST, P.; MARTENS, E.; PAEMEN, L.; KÜSTER, B.; VAN DAMME, J.; DWEK, R. A.; OPDENAKKER, G. Oligosaccharides of recombinant mouse gelatinase B variants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1425, p. 587-598, 1988.

VAN ZYL, W. H.; ROSE, S. H.; TROLLOPE, K.; GORGENS, J. F. Fungal  $\beta$ -mannanases: Mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1203-1213, 2010.

VEENHUIS, M.; VAN DIJKEN, J. P.; HARDER, W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. **Advances in Microbial Physiology**, v. 24, p. 1-82, 1983.

VEIGA, L. F.; VITAL, N. Teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A.; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. **Métodos em ecotoxicologia marinha - Aplicações no Brasil**. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria, 2002. p.111-122.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2006.

VRIES, R. P.; VISSER, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 65, p. 497-522, 2001.

WANG, W. Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 185, p. 129-188, 1999.

WANG, D.; LU, M.; WANG, X.; JIAO, Y.; FANG, Y.; LIU, Z.; WANG, S. Improving stability of a novel dextran-degrading enzyme from marine *Arthrobacter oxydans* KQ11. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 294-299, 2014.

WATERHAM, H. R.; DIGAN, M. E.; KOUTZ, P. J.; LAIR, S. V.; CREGG, J. M. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**, v. 186, p. 37-44, 1997.

WEIJERS, S. R.; RIET, K. V. Enzyme stability in downstream processing. Part 1: Enzyme inactivation, stability and stabilization. **Biotechnology Advances**, n. 10, p. 237-249, 1992.

WEINGARTNER, V. **Produção, purificação e identificação de mananase, obtida por fermentação no estado sólido utilizando cascas de soja e *Aspergillus niger***. Dissertação de Mestrado em Processos Biotecnológicos, Universidade Federal do Paraná, 2010. 161 p.

WILLIAMSON, E. C. M.; LEEMING, J.P.; PALMER, H. M.; STEWARD, C.G.; WARNOCK, D.; MARKS, D. I.; MILLAR, M.R. Diagnosis of invasive aspergillosis in bone marrow transplant recipients by polymerase chain reaction. **British Journal of Haematology**, v. 108, p. 132-139, 2000.

WU, M. C.; TANG, C. D.; LI, J. F.; ZHANG, H. M.; GUO, J. Bimutation breeding of *Aspergillus niger* strain for enhancing  $\beta$ -mannanase production by solid-state fermentation. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2149–2155, 2011.

YAMAZAKI, N.; SINNER, M.; DIETRICH, H. H. Isolierung und eigenschaften einer  $\beta$ -1,4-Mannanase aus *Aspergillus niger*. **Holzforschung**, v. 30, p. 101-109, 1976.

YE, W. N.; COMBES, D. MONSAN, P. Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 10, p. 498-502, 1988.

ZAMBOM, M. A.; SANTOS, G. T.; MODESTO, E. C.; ALCALDE, C. R.; GONÇALVES, G. D.; SILVA, D. C.; SILVA, K. T.; FAUSTINO, J. O. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. **Acta Scientiarum**, v. 23, p. 937-943, 2001.

ZENG, G.; CHENG, M.; HUANG, D.; LAI, C.; XU, P.; WEI, Z.; LI, N.; CHEN, Z.; HE, X.; YAN, H. Study of the degradation of methylene blue by semi-solid-state fermentation of agricultural residues with *Phanerochaete chrysosporium* and reutilization of fermented residues. **Waste Management**, v. 38, p. 424-430, 2015.

ZHANG, L.; TIZZARD, I. R. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from aloe vera gel. **Immunopharmacology**, v. 35, p. 119-128, 1996.

ZHANG, H.; SANG, Q. Production and extraction optimization of xylanase and  $\beta$ -mannanase by *Penicillium chrysogenum* QML-2 and primary application in saccharification of corn cob. **Biochemical Engineering Journal**, v. 97, p. 101-110, 2015.

ZHAO, W.; ZHENG, J.; ZHOU, H. B. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4-b-mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive over expression and high-density fermentation in *Pichia pastoris*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7538-7547, 2011.

ZHU, A.; WANG, Z. K.; BEAVIS, R. Structural studies of  $\alpha$ -n-acetylgalactosaminidase: Effect of glycosylation on the level of expression, secretion efficiency, and enzyme activity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 352, p. 1-8, 1998.

ZHU, T.; YOU, L.; GONG, F.; XIE, M.; XUE, Y.; LI, Y.; MA, Y. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline  $\beta$ -mannanase in *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, p. 407-412, 2011.

ZHU, T.; SUN, H.; LI, P.; XUE, Y.; LI, Y.; MA, Y. Constitutive expression of alkaline  $\beta$ -mannanase in recombinant *Pichia pastoris*. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 2025-2029, 2014.