



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA**

RAÍSSA MAGALHÃES FERREIRA LIMA

**INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA
ALFA-ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) DE *Bacillus subtilis* POR
CULTIVO SUBMERSO VISANDO ESCALONAMENTO**

FORTALEZA

2018

RAÍSSA MAGALHÃES FERREIRA LIMA

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA ALFA-
ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) DE *Bacillus subtilis* POR CULTIVO
SUBMERSO VISANDO ESCALONAMENTO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia industrial.

Orientador: Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

Coorientador (a): Ma. Márcia Valéria Lacerda Soares.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L71i Lima, Raíssa Magalhães Ferreira.
Influência da agitação e da aeração na produção da enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) de *Bacillus subtilis* por cultivo submerso visando escalonamento / Raíssa Magalhães Ferreira Lima. – 2018.
39 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves.
Coorientação: Profa. Ma. Márcia Valéria Lacerda Soares.
1. Alfa-acetolactato descarboxilase. 2. *Bacillus subtilis*. 3. Agitação e aeração. 4. cultivo submerso. I.
Título.

CDD 661

RAÍSSA MAGALHÃES FERREIRA LIMA

INFLUÊNCIA DA AGITAÇÃO E DA AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DA ENZIMA ALFA-
ACETOLACTATO DESCARBOXILASE (ALDC) DE *Bacillus subtilis* POR CULTIVO
SUBMERSO VISANDO ESCALONAMENTO

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção de título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 11/12/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr^a. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr^a. Márjory Lima Holanda Araújo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. André Casimiro de Macedo
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, meu irmão e meus amigos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À minha orientadora, **Prof^ª. Dr^ª. Luciana Rocha Barros Gonçalves**, por me receber em seu laboratório, pela excelente orientação, pelo tempo investido em mim e em meu trabalho e por sempre ter palavras de apoio e de acalento quando necessárias.

Aos professores participantes da banca examinadora **Prof^ª. Dr^ª. Márjory Holanda** e **Prof. Dr^ª. André Casimiro** pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Processos Biotecnológicos (GPBio), pela amizade, pelos momentos de descontração no laboratório e pelas conversas apaziguadoras. Em especial à **Márcia Lacerda** por compartilhar seus conhecimentos comigo.

A todos os meus professores, que me formaram como profissional e como ser humano.

À coordenação do curso de Biotecnologia, em especial ao **Gilmar da Costa**, pela orientação e apoio, imprescindíveis para a minha conclusão de curso.

Às minhas amigas de curso **Agnes Nobre** e **Jéssica Fernandes**, pelas horas de estudo compartilhadas e pelo acolhimento de prontidão.

Ao Movimento Empresa Júnior, por todos os ensinamentos adquiridos e colegas inspiradores. Em especial aos amigos, **Luísa Delfino** e **Lucas Vasconcelos**, pela parceria e companheirismo.

Aos ‘Amigos Descolados’, **Tayná Fiúza**, **Igor Duarte**, **Caroline Landim**, **Wallady Barroso**, **Artur Hermano**, **Marcus Rafael**, **Lia Pinho**, **Larissa Queiroz**, **Ellivelton Lima**, pela experiência acadêmica, conversas e saídas. Vocês são uma inspiração como pessoas e como acadêmicos e fizeram minha permanência na UFC muito mais suave e enriquecedora.

Ao grande amigo **Pedro Rifane**, por me apoiar e me ouvir nos mais diversos e adversos momentos em que precisei, por estar sempre por perto e me acolher.

À minha amiga de curso e da vida **Sara Pires**, pelas incontáveis horas de conversa, pela parceria de todas as horas e por acreditar em mim quando eu mais precisei.

Ao meu amigo da vida **Zé Medeiros**, pelos anos de vida compartilhada crescendo juntos.

Aos meus familiares, **Maria Pereira, Vicente Lima e Vladimir Lima**, por me oferecerem todo o suporte possível e impossível, por me incentivarem e estarem sempre presentes durante todos os ciclos da minha vida.

Por fim, a **todas as pessoas que cruzaram minha vida** durante esses anos e impactaram de toda e qualquer forma, moldando quem sou hoje.

*“Todas as coisas mudam – até mesmo as
nossas esperanças e medos.”*

– Yongey Mingyur Rinpoche

RESUMO

Um dos intermediários produzidos no processo de fermentação alcoólica durante a produção de cerveja é o diacetil, que mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,15 ppm, acarreta uma característica organoléptica indesejável a vários estilos de cerveja, o sabor amanteigado. O descanso do diacetil, processo de remoção desse composto que dura de 2 a 4 semanas, é um passo limitante na maturação da cerveja, tornando-se gargalo na produção e despendendo capital para o armazenamento do produto. A enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) atua evitando a formação do diacetil. Um delineamento experimental foi aplicado para avaliar a influência da agitação e da aeração, em modelo de escala laboratorial, sobre a produção da enzima ALDC de *Bacillus subtilis* ICA56 por cultivo submerso. A produção da enzima ALDC realizada em biorreator durante 14h de cultivo a 37 °C, com diferentes combinações de taxas de agitação (150 rpm, 300 rpm e 450 rpm) e taxas de aeração (0 L/min, 0,5 L/min e 1 L/min). A atividade mais alta ($0,86 \pm 0,036$ U/mL) foi obtida a uma taxa de aeração de 0,5 L/min e uma taxa de agitação de 300 rpm. Para avaliar a atividade enzimática foi utilizada metodologia colorimétrica e para avaliar a influência dos fatores na resposta analisada foi utilizada metodologia de superfície de resposta (SR). A partir dos resultados da presente investigação, pode-se concluir que a variável quadrática da agitação tem um efeito significativo na produção de ALDC de *B. subtilis*. Os efeitos da variável aeração e da interação entre ambas as variáveis não foram significativos. Observou-se um efeito positivo do aumento da taxa de agitação na produção de proteínas totais de *B. subtilis*. Novos estudos são necessários a fim de predizer as condições ótimas de agitação e aeração para a resposta analisada.

Palavras-chave: Alfa-acetolactato descarboxilase; *Bacillus subtilis*; Agitação e aeração; cultivo submerso.

ABSTRACT

One of the intermediates produced in the alcoholic fermentation process during brewing is diacetyl which, even at concentrations as low as 0.15 ppm, carries an undesirable organoleptic characteristic to various styles of beer, the buttery flavor. The diacetyl rest, a process of removal of this compound that lasts from 2 to 4 weeks, is a limiting step in beer maturation, becoming time consuming in production and capital consuming for the storage of the product. The enzyme alpha-acetolactate decarboxylase (ALDC) avoids the formation of diacetyl. An experimental design was applied to evaluate the influence of agitation and aeration, in a laboratory scale, over the production of the enzyme ALDC of *Bacillus subtilis* ICA56 by submerged culture. Production of ALDC enzyme in a bioreactor for 14h culture at 37 °C, with different combinations of stirring rates (150 rpm, 300 rpm and 450 rpm) and aeration rates (0 L/min, 0.5 L/min and 1 L/min). The highest activity ($0,86 \pm 0.036$ U/mL) was obtained at an aeration rate of 0,5 L/min and a stirring rate of 300 rpm. To evaluate the enzymatic activity, a colorimetric methodology was used and response surface methodology was used to evaluate the influence of the factors in the analyzed response. From the results of the present investigation, it can be concluded that the quadratic variable of the agitation has a significant effect on the production of ALDC of *B. subtilis*. The effects of the variable aeration and the interaction between both variables were not significant. A positive effect was observed, upon increasing the stirring rate, on the production of *B. subtilis*' total proteins. Further studies are required in order to predict optimal conditions of agitation and aeration for the analyzed response.

Keywords: ALDC; *Bacillus subtilis*; Agitation and aeration; Submerged culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de ação da ALDC	19
Figura 2 – Medida de atividade enzimática por tempo durante cultivo em frascos	28
Figura 3 – Medida de atividade enzimática de extratos enzimáticos produzidos	29
Figura 4 – Medida de atividade enzimática de porções retida e permeada dos extratos enzimáticos produzidos, concentradas em membrana Millipore 30 kDa	30
Figura 5 – Efeitos da agitação e aeração na indução da síntese da ALDC celular nos extratos enzimáticos de <i>Bacillus subtilis</i> para $p = 0,1$	32
Figura 6 – Influência da agitação e da aeração na indução da síntese da ALDC celular nos extratos enzimáticos de <i>B. subtilis</i> . (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curvas de contorno	34
Figura 7 – Medida de proteínas totais de extratos enzimáticos produzidos	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Peso molecular da ALDC produzida em diferentes microrganismos	19
Tabela 2 – Valores e níveis dos parâmetros	24
Tabela 3 – Delineamento experimental com níveis de variação dos fatores quantitativos, segundo Bona <i>et al.</i> , 2002	24
Tabela 4 – Composição da solução substrato	26
Tabela 5 – Valores de atividade enzimática da enzima ALDC de <i>Bacillus subtilis</i> em extratos enzimáticos obtidos sob diferentes condições de cultivo segundo delineamento experimental	31
Tabela 6 – Análise da variância para avaliação da significância estatística do modelo estimado para a máxima atividade enzimática da ALDC de <i>B. subtilis</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDC	Alfa-acetolactato descarboxilase
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina de soro bovino
FD	Fator de diluição
RPA	Reatores perfeitamente agitados
rpm	Rotações por minuto
SR	Superfície de Resposta

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
μ	Micro
%	Por cento
°C	Graus Celsius
g/L	Gramas por litro
h	Horas
kDa	Quilodalton
L	Litro
L/min	Litro por minuto
m/v	Massa por volume
mg/L	Miligrama por litro
M	Molar
Min	Minuto
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
p	Nível de significância
ppm	Partes por milhão
R ²	Coeficiente de determinação
U	Unidades Internacionais
U/mL	Unidade por mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Enzimas	16
1.1.1	Obtenção de enzimas	17
1.1.1.1	<i>Cultivo microbiano</i>	17
1.1.1.2	<i>Fatores que influenciam na produção e obtenção de enzimas</i>	17
1.1.2	Alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC)	18
1.2	Processo de produção da cerveja	20
1.2.1	Diacetil	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Microrganismo	23
3.2	Meio de cultivo	23
3.3	Avaliação da cinética de produção da ALDC	23
3.4	Delineamento experimental	24
3.5	Produção da enzima ALDC	24
3.6	Produção de extrato enzimático	25
3.7	Obtenção do concentrado do extrato proteico	25
3.8	Análises	25
3.8.1	<i>Atividade enzimática da ALDC</i>	25
3.8.2	<i>Proteínas totais</i>	26
3.9	Análises estatísticas	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
4.1	Cinética de produção da ALDC em frascos	28
4.2	Influência da aeração e agitação na atividade enzimática da ALDC	29
4.3	Produção proteica de <i>B. subtilis</i> sob diferentes condições	35
5	CONCLUSÃO	37
	REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

A enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) vem sendo utilizada pela indústria cervejeira como um aditivo na etapa de processamento, evitando a formação do diacetil, um composto de sabor indesejado (*off-flavor*) na maior parte dos estilos de cervejas disponíveis no mercado. O descanso do diacetil, processo de degradação não-enzimática desse *off-flavor*, pode durar de 2 a 4 semanas, de modo a representar um gargalo no processo de produção no que se trata do consumo de tempo e de energia.

A ALDC disponibilizada comercialmente possui origem microbiana, sendo produzida, em sua maioria, por empresas europeias através de cepas geneticamente modificadas da espécie *Bacillus subtilis*. Tendo em vista os custos gerados pela importação de tal produto, encontra-se na literatura estudos que visam à produção da enzima em cepas nativas, destacando-se entre elas a cepa ICA 56, oriunda do manguezal Icapuí (Estado do Ceará, Brasil). O presente trabalho tem como objetivo avaliar os efeitos da agitação e da aeração de sobre a produção intracelular da enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) de *Bacillus subtilis* ICA 56 por cultivo submerso visando escalonamento.

1.1 Enzimas

Enzimas, também conhecidas como biocatalizadores, são moléculas proteicas complexas de origem biológica que iniciam ou aceleram a taxa de uma reação bioquímica em um organismo vivo, sem serem elas próprias consumidas na reação (KUDDUS, 2019). Tais biocatalisadores possuem grande especificidade por seu substrato (LI *et al.*, 2012) e sua dosagem é realizada pela medida de sua atividade, avaliada pela velocidade da reação que a enzima catalisa. Esta é expressa em Unidades Internacionais, de modo que uma *Unidade Internacional* (U) é a quantidade de enzima capaz de formar 1 μmol de produto por minuto em condições ótimas de medida (BORZANI *et al.*, 2001).

Tendo em vista sua capacidade de realizar transformações químicas com alta especificidade e de atuar ativamente *in vitro*, estas moléculas tornam-se cada vez mais úteis em processos industriais (KUDDUS, 2019). Desse modo, a complementação a partir do uso de enzimas é uma opção eficiente (GODFREY e WEST, 1996) que melhora a produtividade em termos de redução de consumo de energia e de poluição ambiental (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2016). Na indústria alimentícia, as enzimas microbianas têm

sido amplamente utilizadas para aumentar a diversidade, a variedade e a qualidade dos alimentos (SINGH, SINGH e SACHAN, 2019), sendo a maioria destas empregada como aditivos na etapa de processamento (ADRIO e DEMAIN, 2014).

1.1.1 Obtenção de enzimas

As enzimas estão presentes em todos os organismos vivos, no entanto, enzimas comerciais são, de modo geral, obtidas a partir de três fontes principais: animais, plantas e microrganismos. Biocatalizadores de origem microbiana são mais utilizados em processos industriais (PANDEY *et al.*, 1999; SABU, 2003) em virtude de seu baixo custo de produção, sua maior previsibilidade, a facilidade de obtenção da matéria-prima para seu cultivo e seu menor potencial nocivo (KUDDUS, 2019). Os microrganismos são isolados de habitats naturais e, através da otimização de suas condições de crescimento, usados para a produção da enzima desejada por um processo conhecido como cultivo microbiano (KUDDUS, 2019).

1.1.1.1 Cultivo microbiano

Para processos industriais, o cultivo microbiano é utilizado com a finalidade de produzir enzimas de forma rentável, para competir com os processos convencionais (PILNICK, 2019). O cultivo microbiano submerso tem sido amplamente utilizado para a produção industrial de enzimas (PANDEY, 2003) e é quase exclusivamente empregado para enzimas bacterianas, já que o crescimento dessas células e sua produção enzimática são mais adequados em uma condição submersa do que quando comparados a outras formas de cultivo (SINGH e KUMAR, 2019).

1.1.1.2 Fatores que influenciam na produção e obtenção de enzimas

O desenvolvimento de um processo de cultivo microbiano inclui a escolha das condições operacionais, tais como composição do meio de cultura, tipo de cultivo, pH, temperatura, entre outros. Ademais, independentemente do tipo de bioprocesso, o esforço e o tempo gastos devem ser considerados (SINGHANIA, PATEL e PANDEY, 2010). O crescimento microbiano e sua produção de metabólitos em biorreatores são influenciados, além dos fatores citados, por agitação, aeração e tempo de cultivo (ZHOU *et al.*, 2018). Na

cultura de microrganismos aeróbicos, o oxigênio serve como substrato para geração de energia, podendo influenciar no crescimento celular e na produção de proteínas diretamente ou através de mudanças na morfologia (ABD-AZIZ *et al.*, 2008). Em reatores perfeitamente agitados (RPA), isso é obtido principalmente pela interrelação dos fatores geométricos do reator utilizado e das configurações de aeração e de agitação (FENICE *et al.*, 2012), portanto, é necessário estabelecer uma combinação ótima entre esses parâmetros visando o máximo rendimento (POTUMARTHI, CH. e JETTY, 2007).

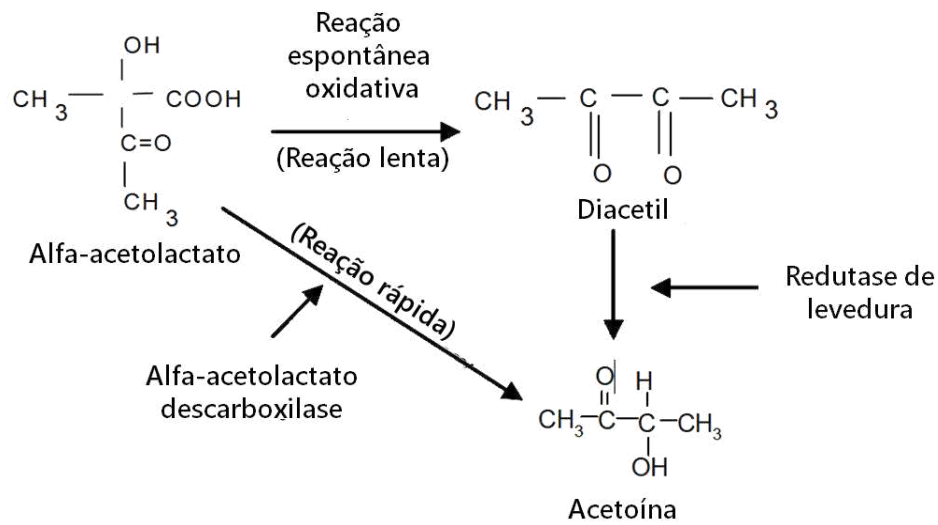
A aeração determina a oxigenação do processo de cultivo microbiano e também contribui para a mistura do meio de cultivo, especialmente quando as velocidades mecânicas de agitação são baixas (ZHOU *et al.*, 2018). A aeração não apenas fornece o oxigênio necessário para o crescimento celular, mas também elimina gases gerados durante o processo (MANTZOURIDOU, ROUKAS e KOTZEKIDOU, 2002).

A agitação desempenha é favorável à mistura nos processos, não só melhorando a transferência de massa e oxigênio entre as diferentes fases, mas também mantendo condições químicas e físicas homogêneas no meio, através de uma mistura contínua (ZHOU *et al.*, 2018). Uma agitação realizada de forma descontrolada gera efeito potencialmente negativo, de modo que altera a força de cisalhamento, influenciando diretamente no crescimento dos microrganismos, como em mudanças na morfologia, no padrão de crescimento e formação de metabólitos e até mesmo ao causar danos irreparáveis às estruturas celulares. Essa velocidade de agitação também dependerá da resistência do organismo ao cisalhamento e do seu estado morfológico (FELSE e PANDA, 2000).

1.1.2 Alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC)

A alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) [E.C. 4.1.1.5] catalisa a conversão dos enantiômeros (R)- e (S)- do substrato acetolactato para gerar (R)-acetoína (JI *et al.*, 2018) (Figura 1 – Reação rápida), sendo produzida por diversos microrganismos (GOUPIL-FEULLERAT *et al.*, 1997) apresentando massas moleculares distintas em cada um deles, como descrito na Tabela 1. A acetoína desempenha vários papéis fisiologicamente importantes em microrganismos, prevenindo a acidificação intracelular (VIVIJS *et al.*, 2014) e podendo ser utilizada como fonte de carbono durante a fase estacionária, em caso de escassez de outras fontes de energia (GOUPIL-FEULLERAT *et al.*, 1997).

Figura 1 – Mecanismo de ação da ALDC



Fonte: adaptação de Hannemann (2002).

Tabela 1 – Peso molecular da ALDC produzida por diferentes microrganismos

<i>Microrganismo</i>	<i>Massa molecular (kDa)</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	28,9
<i>Brevibacillus brevis</i>	35
<i>Brevibacillus brevis</i>	70
<i>Exiguibacterium acetylicum</i>	31
<i>Exiguibacterium acetylicum</i>	62
<i>Klebsiella aerogenes</i>	73
<i>Lactobacillus casei</i>	27,5
<i>Lactobacillus casei</i>	48
<i>Lactococcus lactis</i>	26,5
<i>Lactococcus lactis</i>	150
<i>Leuconostoc lactis</i>	49
<i>Leuconostoc lactis</i>	100

Fonte: dados obtidos no banco de dados BRENDA Enzymes <
<https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=4.1.1.5>>.

Atuando como biofábricas celulares para produção de proteínas, espécies do gênero *Bacillus* têm sido utilizadas devido às suas excelentes propriedades de cultivo e a

completa ausência de subprodutos tóxicos. Dessa forma, a espécie *B. subtilis* tem sido intensamente estudada ao longo dos anos e é atualmente a bactéria Gram-positiva melhor caracterizada (EARL *et al.*, 2010).

B. subtilis é considerado um organismo GRAS (geralmente reconhecido como seguro) e, por essa razão, a aplicação de seus produtos na indústria de alimentos é altamente favorecida, como por exemplo, na etapa de maturação da produção de cervejas (WESTERS, WESTERS e QUAX, 2004).

A produção da ALDC em *Bacillus subtilis* ocorre de forma intracelular, fazendo-se necessária etapa de rompimento celular para extração da enzima de interesse. A cepa ICA 56 foi caracterizada com um bom potencial de produção, em uma avaliação comparativa entre 6 cepas nativas potencialmente produtoras da ALDC, estudo já realizado por nosso grupo de pesquisa (LEMOS, 2015).

1.2 Processo de produção de cerveja

Por definição, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009). O método convencional de fabricação de cerveja leva de 2 a 12 semanas. (CHOI, AHN e KIM, 2015). A maioria das cervejas é produzida a partir de grãos que passaram por um processo conhecido como malteação, no qual o cereal é embebido em água para ativar o metabolismo, germinado por um curto período, a fim de sintetizar enzimas que auxiliarão na etapa de sacarificação, e, por fim, secados (BAMFORTH, 2017).

No processo de brassagem, os grãos moídos são infundidos em água quente para permitir que os grânulos de amido se gelatinizem e tornem-se passíveis de digestão pelas amilases, tornando disponíveis açúcares simples e fermentescíveis para ação da levedura na etapa de fermentação. Em seguida, o líquido, conhecido como mosto, passa pela etapa de filtração, a fim de drenar apenas o líquido açucarado que será fervido, tradicionalmente com lúpulo para extrair amargor e aroma (BAMFORTH, 2017).

Para a fermentação primária, o mosto proveniente da etapa de brassagem é resfriado e inoculado com a levedura, sendo fermentado por cerca de 3 a 15 dias. A maioria dos compostos de sabor (conhecidos como *flavors*) e de sabor desagradável (conhecidos como *off-flavors*) são produzidos durante essa etapa. Em fermentação secundária ou maturação, que leva cerca de 7 a 30 dias, o diacetil é lentamente reduzido a compostos com menos sabor por

um processo chamado de descanso do diacetil, que é o processo mais demorado na produção de cerveja (CHOI, AHN e KIM, 2015).

1.2.1 Diacetil

Um dos intermediários produzidos durante a fermentação é o diacetil, uma dicetona vicinal produzida pela levedura como um subproduto da descarboxilação oxidativa do alfa-acetolactato, processo que ocorre de forma espontânea e lenta, como observado na Figura 1 – Reação lenta (KROGERUS; GIBSON, 2013). Esse intermediário, mesmo que em baixas concentrações, como 0,15 ppm, acarreta uma característica organoléptica indesejável a vários estilos de cerveja, o sabor amanteigado (KABAKTSCHIEVA, 1994).

Durante o processo convencional de maturação da cerveja, sem a aplicação de enzimas, o diacetil é naturalmente transformado em acetoína por redução (KABAKTSCHIEVA, 1994) ao longo de um período de 2 a 4 semanas. Desse modo, o descanso do diacetil torna-se um gargalo na produção cervejeira, pois demanda capital para o armazenamento do produto. A enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) tornou-se disponível em 1991 (BONCIU e STOICESCU, 2007) e vem sendo utilizada para acelerar a maturação da cerveja, convertendo o alfa-acetolactato diretamente em acetoína, evitando a formação do diacetil (HANNEMANN, 2002). Os principais benefícios do uso da enzima ALDC no processo de produção são o menor tempo de processamento, menor consumo de energia, maturação mais curta e teor controlado de diacetil no produto final (LEMOS, 2005).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visa avaliar a influência da agitação e da aeração, em modelo de escala laboratorial, sobre a produção intracelular da enzima alfa-acetolactato descarboxilase (ALDC) de *Bacillus subtilis* por cultivo submerso.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência da aeração e da agitação isoladas e combinadas sobre a produção da enzima ALDC em cultivo microbiano submerso;
- Determinar as condições ótimas de produção enzimática para as variáveis estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo

A cepa de *Bacillus subtilis* ICA 56 foi previamente isolada de solo do manguezal Icapuí (Estado do Ceará, Brasil) e foi cedido pelo Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBiotech) da Universidade Federal do Ceará. A sequência do gene 16S rRNA de ICA56 pode ser acessada no GenBank (KM235112). A cepa foi mantida em meio ATGE – composto por 15,0 g/L ágar, 5,0g/L triptona, 1,0 g/L glicose e 2,5 g L extrato de levedura – a 4 °C.

3.2 Meio de cultivo

Nesse estudo, utilizou-se para a produção da enzima, o meio de cultivo sugerido por Lemos (2015), sendo este composto por fosfato de potássio dibásico (1,0 g/L), fosfato monossódico (1,0 g/L), sulfato de amônio (2,5 g/L), cloreto de sódio (0,250 g/L), sulfato de magnésio (0,2 g/L), cloreto férrico (0,04 g/L), sulfato de manganês (0,250 mg/L), glicose (10,0 g/L) e extrato de levedura (3,0 g/L). O meio foi esterilizado em autoclave nas condições de 1 atm, 110 °C por 10 minutos.

3.3 Avaliação da cinética de produção da ALDC

Inicialmente, a ICA 56 foi repicada em placas contendo meio ATGE e incubada a 30 °C por 24 h para ativação. Para produção do pré-inóculo, três colônias foram transferidas para frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 20 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Tecnal-TE240, São Paulo, Brasil) a 150 rpm, 37 °C por 6 h.

A produção da enzima ALDC foi realizada em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 150 mL de meio de cultivo. Uma alíquota de 15 mL do pré-inóculo (10%, v / v) foi transferida para os frascos, os quais foram mantidos em um agitador orbital (Tecnal-TE240) a 150 rpm, 37 °C. O experimento foi conduzido por 24 h com coleta de 3 alíquotas nos tempos 14 h, 16 h e 18 h de cultivo para posterior processamento e análise da medida de atividade enzimática, a fim de identificar o ponto com maior atividade alfa-acetolactato

descaboxilásica.

3.4 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi idealizado de acordo com planejamento fatorial completo, do tipo b^k de segunda ordem, sendo realizados uma replicata dos ensaios dos pontos axiais e triplicata do ponto central, de acordo com Saramago *et al.* (2008) e Bona *et al.* (2002), tendo seus valores e níveis descritos nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Valores e níveis dos parâmetros

<i>Nível dos Parâmetros</i>	<i>Agitação (x_1)</i>	<i>Aeração (x_2)</i>
-1	150	0
0	300	0,5
1	450	1

Fonte: elaborada pela autora.

Tabela 3 – Delineamento experimental com níveis de variação dos fatores quantitativos, segundo Bona *et al.*, 2002

<i>Ensaio</i>	<i>Planejamento Fatorial Completo</i>			
	<i>Variáveis Codificadas</i>		<i>Variáveis Originais</i>	
	x_1	x_2	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Aeração (L/min)</i>
1	-1	-1	150	0
2	+1	-1	450	0
3	-1	+1	150	1
4	+1	+1	450	1
5	0	0	300	0,5

Fonte: elaborada pela autora.

3.5 Produção da enzima ALDC

Inicialmente, a ICA 56 foi repicada em placas contendo meio ATGE e incubada a 30 °C por 24 h para ativação. Para produção do pré-inóculo, três colônias foram transferidas

para frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 65 mL de meio de cultivo. Os frascos foram incubados em agitador orbital (Tecnal-TE240, São Paulo, Brasil) a 150 rpm, 37 °C por 6 h.

A produção da enzima ALDC foi realizada em biorreator (Tecnal TEC-BIO-1,5, São Paulo, Brasil) contendo 650 mL de meio de cultivo. Uma alíquota de 65 mL do pré-inóculo (10% v/v) foi transferido para o biorreator, os quais foram mantidos a 37 °C, com diferentes combinações de taxas de agitação (150 rpm, 300 rpm e 450 rpm) e taxas de aeração (0 L/min, 0,5 L/min e 1 L/min), segundo o delineamento experimental.

Os ensaios foram conduzidos durante 14 horas e, após o cultivo, o meio foi submetido à centrifugação a 5.000 rpm por 20 minutos, descartando o sobrenadante formado para obtenção das células em pellets.

3.6 Produção de extrato enzimático

Para a produção do extrato enzimático, após ressuspensão dos *pellets* em solução tampão 2-(N-morfolino) etanossulfônico monohidratado (MES) 0,05 M, pH 6,0, as células foram submetidas a ruptura por ponteira emissora de ondas ultrassônicas (equipamento Qsônica Q500), em banho de gelo, a 40% de potência com pulsos de 10 segundos *on* e 20 segundos *off*, durante 10 minutos. Após a lise celular, centrifugou-se o lisado a 5.000 rpm por 20 min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado considerado o extrato enzimático produzido e utilizado para determinação de atividade enzimática.

3.7 Obtenção de concentrado do extrato proteico

Centrifugou-se 10 mL do extrato enzimático a 5.000 rpm por 20 min a 4°C utilizando o concentrador de proteínas Amicon® Ultra-15 com membrana de 30 kDa para obtenção das porções retida e permeada do extrato enzimático produzido.

3.8 Análises

3.8.1 Atividade enzimática da ALDC

Utilizou-se, para medida de atividade enzimática, o método colorimétrico baseado na metodologia adaptada de Rasmussen *et al.* (1985), onde a enzima é incubada em solução

substrato (Tabela 4) durante 20 minutos a 30 °C. Posteriormente, é adicionado hidróxido de sódio 1 M, α -naftol (1% m/v) e creatina (0,1% m/v) que reage durante 40 minutos. Ao fim da reação colorimétrica, foi medida a absorvância de uma alíquota a 522 nm. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a Equação 1.

Tabela 4 – Composição da solução substrato

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>
NaOH 1M	300 μ L
Água destilada	300 μ L
Tampão MES 0,05 M pH 6,0	4,3 mL
Etil-2-acetoxi-2-metilacetoacetato (substrato)	10 μ L

Fonte: elaborada pela autora.

$$\frac{\text{Unidades}}{\text{mL enzima}} = \frac{(\mu\text{mol de acetoina produzida}) \times 4,9 \times (FD)}{(20) \times (0,2)} \quad (1)$$

Onde:

4,9 = Volume Total de Amostra (mL)

FD = Fator de Diluição

20 = Tempo em minutos da reação enzimática

0,2 = Volume de enzima usada (mL)

3.8.2 Proteínas totais

A concentração de proteínas presente no extrato enzimático foi determinada segundo Bradford (1976) usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A absorvância, a 595 nm, foi medida após 10 minutos do início da reação, sendo o branco para execução da curva composto por 20 μ L de água destilada e 1 mL do reagente de Bradford.

3.9 Análises estatísticas

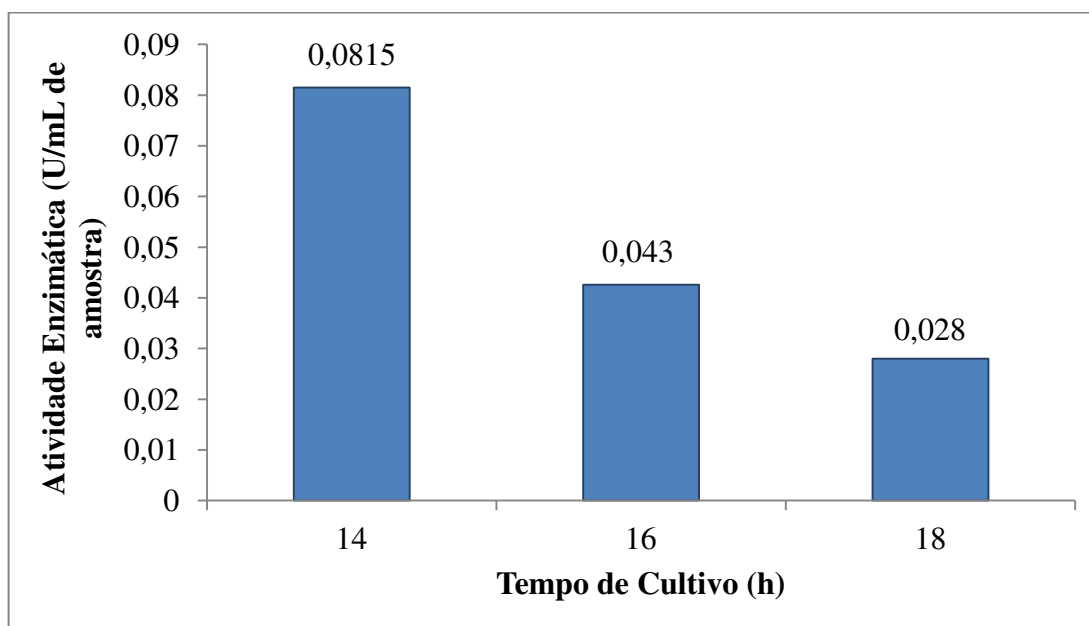
A construção da Superfície de Resposta (SR) foi realizado com o auxílio do software MiniTab 18.1 (Minitab Inc.). Para a decisão estatística, foram considerados significativos os valores de “p” menores que 0,1 (nível de significância de 90%). As avaliações de significância dos níveis dos fatores e as interações entre os fatores foram realizadas empregando análise de variância (ANOVA).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cinética de produção da ALDC em frascos

Com o objetivo de validar algumas características da bactéria *Bacillus subtilis* quanto a produção da ALDC e sua atividade enzimática, já estudadas em nosso grupo de pesquisa (LEMOS, 2015), foram realizados ensaios em frascos agitados a 150 rpm e com aeração de 0 L/min. Os resultados obtidos através da análise de medida colorimétrica de atividade enzimática, feito durante a produção em frascos e após o processamento das amostras, são apresentados no Figura 2.

Figura 2 – Medida de atividade enzimática por tempo durante cultivo em frascos



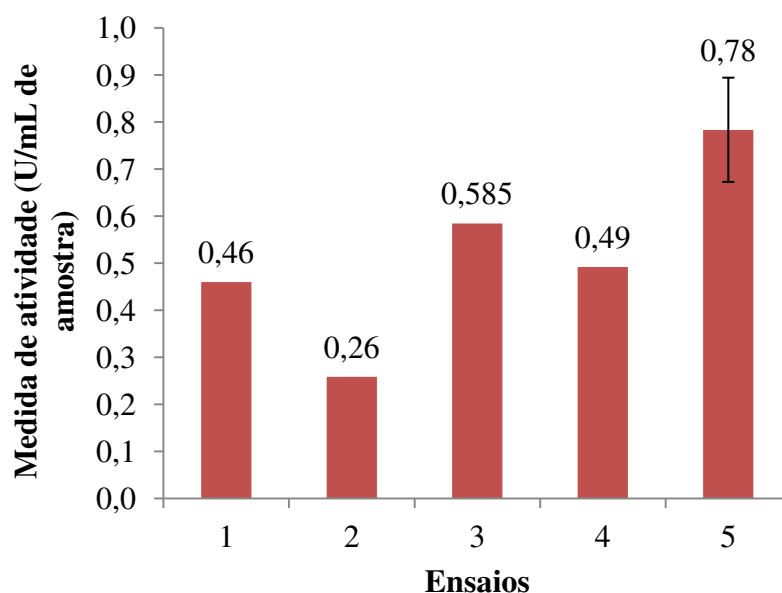
Fonte: elaborado pela autora.

Observando-se a Figura 2 constata-se que a atividade enzimática máxima da ALDC ocorreu às 14h de cultivo, corroborando com estudos em andamento no nosso grupo de pesquisa.

4.2 Influência da aeração e agitação na atividade enzimática da ALDC

A partir das medidas de análise de cultivo previstas no delineamento experimental, observa-se um efeito positivo do aumento da taxa de agitação na atividade enzimática (Figuras 3 e 4) ao serem comparados os cultivos de mesmo fluxo de oxigênio. Comparando-se cultivos com mesma taxa de agitação, observa-se o efeito negativo do aumento do fluxo de oxigênio.

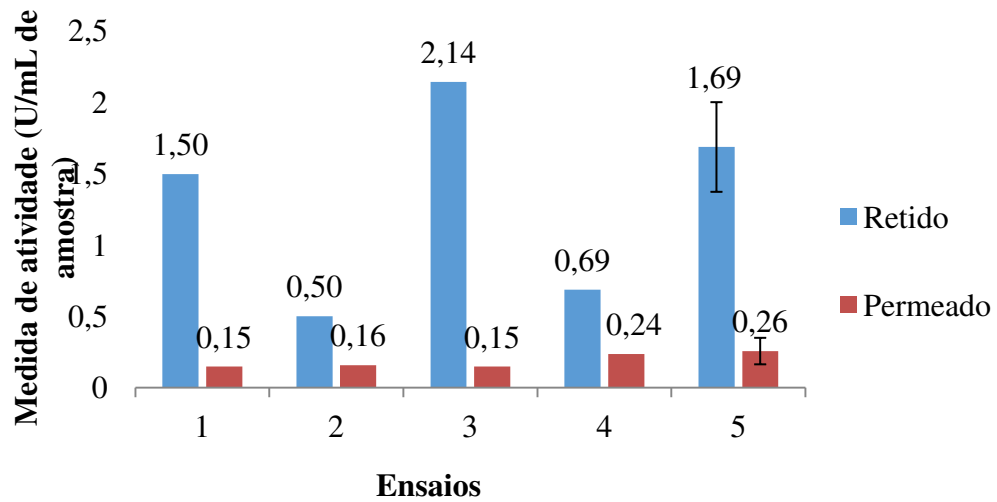
Figura 3 – Medida de atividade enzimática de extratos enzimáticos produzidos



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda – As condições aeração e agitação dos cultivos são: 1- 0 L/min, 150 rpm; 2- 1 L/min, 150 rpm; 3- 0 L/min, 450 rpm; 4- 1 L/min, 450 rpm; 5- 0,5 L/min, 300 rpm.

Figura 4 – Medida de atividade enzimática de porções retida e permeada dos extratos enzimáticos produzidos, concentradas em membrana Millipore 30 kDa



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda – As condições aeração e agitação dos cultivos são: 1- 0 L/min, 150 rpm; 2- 1 L/min, 150 rpm; 3- 0 L/min, 450 rpm; 4- 1 L/min, 450 rpm; 5- 0,5 L/min, 300 rpm.

A Tabela 5 exibe os valores de atividade enzimática da ALDC de *Bacillus subtilis* nos extratos enzimáticos obtidos sob diferentes condições de cultivo segundo delineamento experimental.

Tabela 5 – Valores de atividade enzimática da enzima ALDC de *Bacillus subtilis* em extratos enzimáticos obtidos sob diferentes condições de cultivo segundo delineamento experimental.

<i>Experimento</i>	<i>Agitação (rpm)</i>	<i>Aeração (L/min)</i>	<i>Atividade enzimática (U/mL)</i>
1	150	0	0,4602
2	450	0	0,5847
3	150	1	0,2585
4	450	1	0,4919
5 (C)	300	0,5	0,6447
6 (C)	300	0,5	0,8636
7 (C)	300	0,5	0,8417

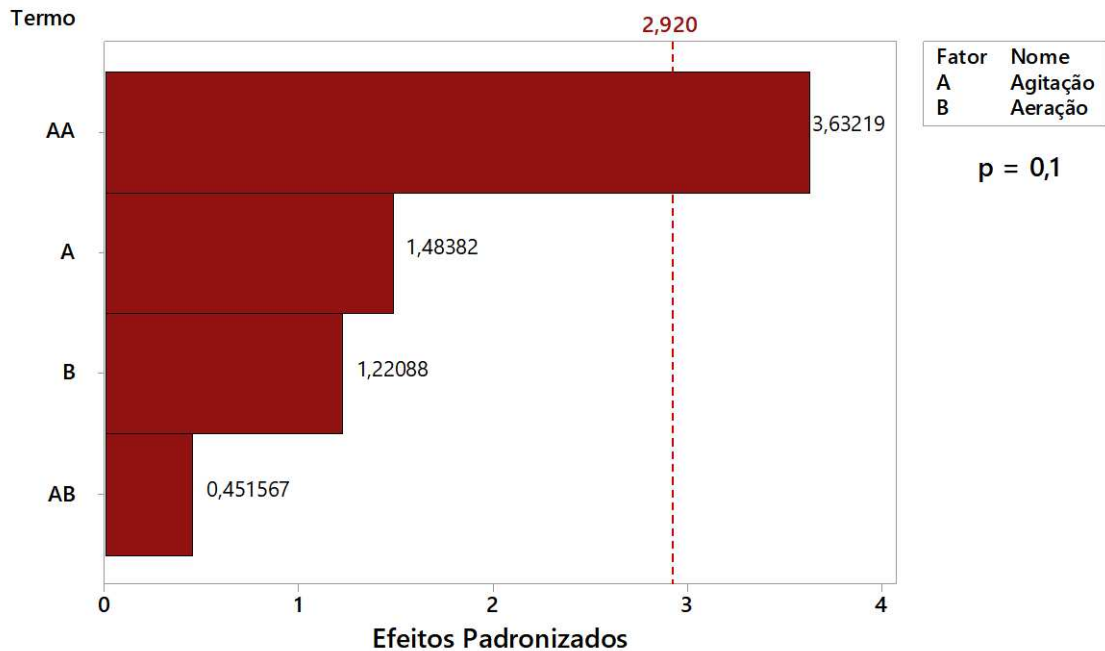
Fonte: elaborada pela autora.

Legenda – (C): Pontos Centrais

Como descrito na Tabela 5, a maior concentração de atividade enzimática foi de 0,86 U/mL, obtida no experimento 6, com agitação de 300 rpm e aeração de 0,5 L/min, enquanto o menor teor de atividade enzimática foi 0,26 U/mL, obtida no experimento 3, sob a condição de 150 rpm e 1 L/min de aeração. A média e o desvio padrão da média de atividade obtidos dos 3 ensaios relacionados ao ponto central foi de $0,7833 \pm 0,11$ U/mL, sugerindo a reprodutibilidade do experimento.

Os efeitos da agitação e da aeração na indução da síntese da ALDC celular presente nos extratos enzimáticos de *Bacillus subtilis* estão mostrados na Figura 5.

Figura 5 – Efeitos da agitação e aeração na indução da síntese da ALDC celular nos extratos enzimáticos de *Bacillus subtilis* para $p = 0,1$



Fonte: elaborada pela autora.

De acordo com o gráfico de Pareto (Figura 5), a variável quadrática que afetou, de forma positiva, a atividade enzimática foi a agitação. Porém, um aumento linear da mesma variável não tem efeito significativo sobre a resposta analisada. As variáveis lineares, assim como a interação entre elas, não tiveram efeito significativo sobre a atividade enzimática da ALDC de *B. subtilis*.

As variáveis consideradas nesse estudo foram explicadas por um modelo matemático quadrático (Equação 2) onde a atividade enzimática foi dada em função de agitação e aeração.

$$Y = 0,7834 + 0,0895 \times \text{Agitação} - 0,3345 \times \text{Agitação} \times \text{Agitação} + 0,0272 \times \text{Agitação} \times \text{Agitação} \quad (2)$$

Para verificar a significância estatística do modelo obtido, fez-se a análise de variância, a qual é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 – Análise da variância para avaliação da significância estatística do modelo estimado para a máxima atividade enzimática da ALDC de *B. subtilis*

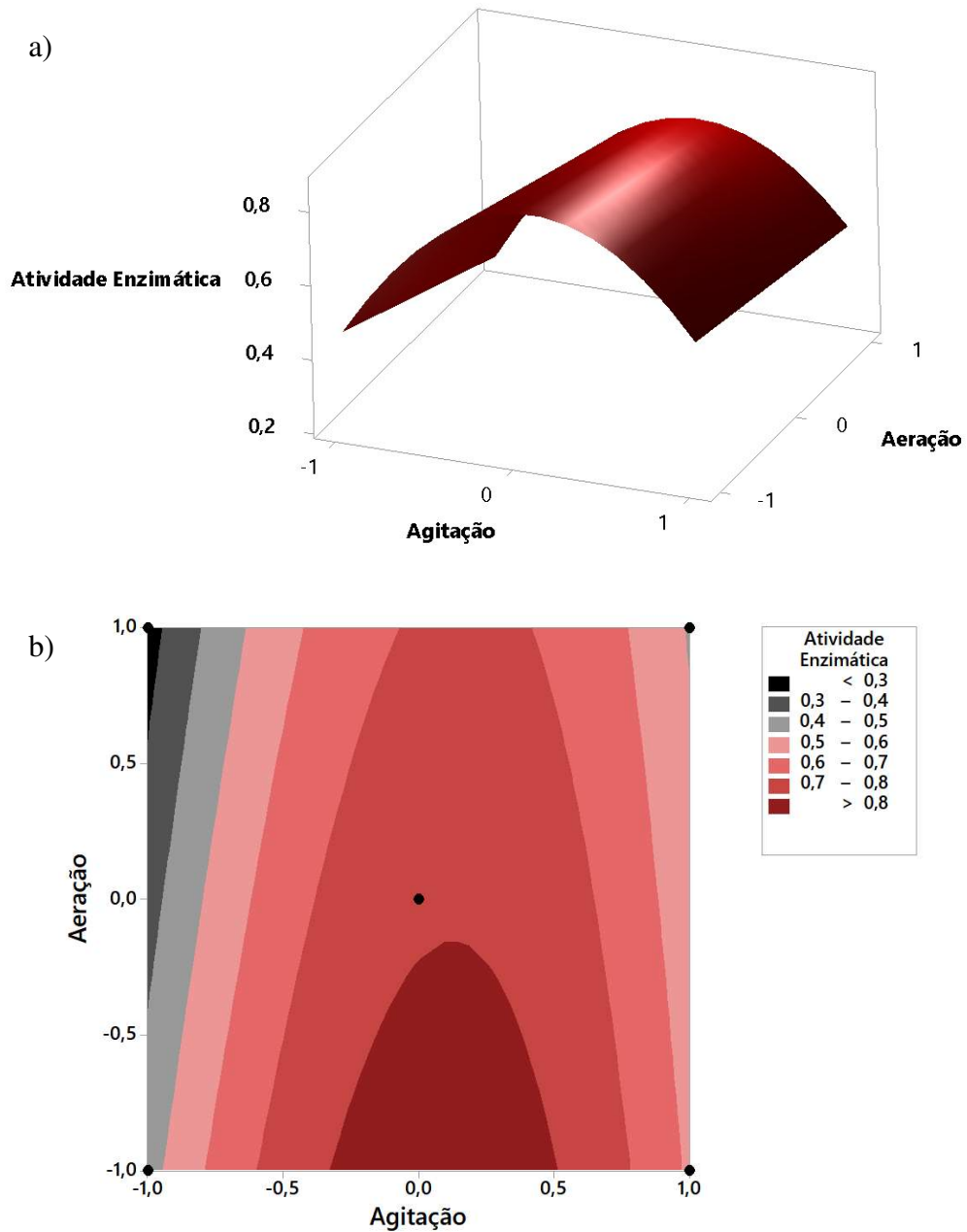
<i>Fonte de variação</i>	<i>Grau de Liberdade</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>Valor-P</i>
Modelo	4	0,248499	0,062125	0,199
Agitação	1	0,032016	0,032016	0,276
Aeração	1	0,021675	0,021675	0,347
Agitação*Agitação	1	0,191843	0,191843	0,068
Agitação*Aeração	1	0,002965	0,002965	0,696
Erro	2	0,029083	0,014542	
Total	6	0,277582		
R ²	0,8952			

Fonte: elaborada pela autora.

O valor do coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,89, explicando 89,52% da variação da atividade enzimática, não permitindo, no entanto, a extrapolação que se deseja para a predição das condições ótimas de cultivo.

A metodologia de superfície de resposta definiu as condições mais adequadas que maximizam a atividade enzimática da ALDC. Os gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno para a variável resposta indicaram o perfil de influência da agitação e da aeração no modelo (Figura 6).

Figura 6 – Influência da agitação e da aeração na indução da síntese da ALDC celular nos extratos enzimáticos de *B. subtilis*. (a) Gráfico de superfície de resposta e (b) Gráfico de curvas de contorno



Fonte: elaborada pela autora.

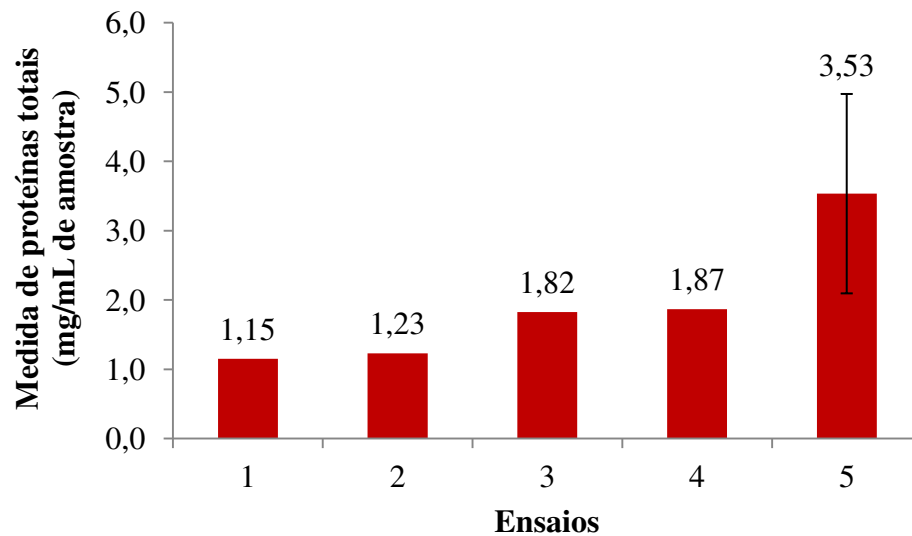
A superfície de resposta (Figura 6a) demonstra que os efeitos positivos da agitação foram observados até um nível limiar, após o qual os efeitos negativos começaram. A curva de contorno (Figura 6b) mostrou uma superfície bidimensional cuja resposta é expressa por um diagrama de diferentes cores que mostram concentrações de atividade enzimática

superiores a 0,3 U/mL e inferiores a 0,8 U/mL. Os pontos no gráfico representam os experimentos realizados em relação às variáveis, estando situados em áreas que indicam a atividade enzimática obtida. A maior concentração de atividade enzimática no presente trabalho foi de 0,86 U/mL com agitação de 300 rpm e aeração de 0,5 L/min. Pela análise da Figura 3b foi possível observar áreas referentes à mesma resposta de atividade enzimática, mas que foram correspondentes a faixas de agitação e aeração diferentes, significando, por exemplo, que para se atingir uma mesma atividade enzimática ($> 0,8$ U/mL), é possível utilizar diferentes combinações dos fatores agitação/aeração (rpm/L.min^{-1}) de 300/0 ou 300/0,25. Dessa forma, podem ser escolhidos quais parâmetros utilizar considerando outros aspectos de processos produtivos, como o custo ou corrosão de equipamentos.

4.3 Produção proteica de *B. subtilis* sob diferentes condições

Os teores de proteínas observados nos extratos enzimáticos estão apresentados na Figura 7.

Figura 7 – Medida de proteínas totais de extratos enzimáticos produzidos



Fonte: elaborado pela autora.

Legenda – As condições aeração e agitação dos cultivos são: 1- 0 L/min, 150 rpm; 2- 1 L/min, 150 rpm; 3- 0 L/min, 450 rpm; 4- 1 L/min, 450 rpm; 5- 0,5 L/min, 300 rpm.

A partir da medida de análise de proteínas totais dos cultivos microbianos previstos no delineamento experimental, observa-se um efeito positivo do aumento da taxa de agitação na produção de proteínas totais de *B. subtilis* (Figura 7) ao compararem-se as ensaios 1 e 3, com fluxo de oxigênio de 0 L/min, e as ensaios 2 e 4, com fluxo de oxigênio de 1 L/min. Sugerindo que o aumento do fornecimento de oxigênio é favorável à produção de proteínas totais do microorganismo.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados da presente investigação, pode-se concluir que a variável quadrática da agitação teve um efeito significativo na produção de ALDC de *B. subtilis*. Os efeitos da variável aeração e da interação entre ambas as variáveis estudadas não foram significativos. Novos estudos são necessários a fim de predizer as condições ótimas de agitação e de aeração para a resposta analisada.

REFERÊNCIAS

- ABD-AZIZ, S. *et al.* Effect of agitation and aeration rates on chitinase production using *Trichoderma virens* UKM1 in 2-l stirred tank reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 2, p. 193–204, 2008.
- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117–139, 2014.
- BAMFORTH, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 8, n. 1, p. 161–176, 2017.
- BONA, E. *et al.* Planejamento e otimização de sistemas mistos controlados por variáveis qualitativas e quantitativas. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 6, p. 1843–1850, 2002.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. e BRUNS, R. E. (1995). Planejamento e Otimização de Experimentos. Editora da UNICAMP, Campinas, SP. 299, p.3.
- BORZANI, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial: Fundamentos**. 2^a edição ed. São Paulo, SP: Editora Blücher, 2001.
- BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 04 jun. 2009.
- CHANDRASEKARAN, M. *et al.* Enzymes in Food and Beverage Production: An Overview. *In*: CHANDRASEKARAN, M. (Ed.). **Enzymes in Food and Beverage Processing**. 1^a ed. [s.l.] CRC Press, 2016. p. 117–137.
- CHOI, E. J.; AHN, H. W.; KIM, W. J. Effect of α -acetolactate decarboxylase on diacetyl content of beer. **Food Science and Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 1373–1380, 2015.
- EARL, A. M. *et al.* Ecology and genomics of *B.subtilis*. v. 16, n. 6, p. 1–11, 2010.

FELSE, P. A.; PANDA, T. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors - The influence of agitator speed. **Biochemical Engineering Journal**, v. 4, n. 2, p. 115–120, 2000.

FENICE, M. *et al.* Combined effects of agitation and aeration on the chitinolytic enzymes production by the Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003. **Microbial Cell Factories**, v. 11, n. 1, p. 12, 2012.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2^a ed. [s.l.] London: Macmillan, 1996.

GOUPIL-FEULLERAT, N. *et al.* Dual role of α -acetolactate decarboxylase in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 20, p. 6285–6293, 1997.

JI, F. *et al.* Structural and enzymatic characterization of acetolactate decarboxylase from *Bacillus subtilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 15, p. 6479–6491, 2018.

KUDDUS, M. Introduction to Food Enzymes. *In*: KUDDUS, M. (Ed.). . **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. 1^a ed. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 1–18.

LEMONS, C. M. G. D. F. **Produção e Imobilização da Enzima α -Acetolactato Descarboxilase em Agarose Utilizando Diferentes Protocolos de Ativação**. [s.l.] Universidade Federal do Ceará (UFC), 2015.

LI, S. *et al.* Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 2012.

MANTZOURIDOU, F.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Effect of the aeration rate and agitation speed on β -carotene production and morphology of *Blakeslea trispora* in a stirred tank reactor: Mathematical modeling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 10, n. 2, p. 123–135, 2002.

NEUHOFF, V. *et al.* Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, p. 255–262, 1988.

PANDEY, A. *et al.* Solid state fermentation for the production of industrial enzyme. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 149–162, 1999.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PILNICK, W. Chapter 3 - Enzymes in the Beverage Industry. *In*: KUDDUS, M. (Ed.). . **Enzymes in Food Technology**. 1^a ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 29–43.

POTUMARTHI, R.; CH., S.; JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-2042: Effect of aeration and agitation regimes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 185–192, 2007.

RASMUSSEN, A. M. *et al.* Purification of α -acetolactate decarboxylase from *Lactobacillus casei* DSM 2547. **Carlsberg Research Communications**, v. 50, n. 2, p. 73–82, 1985.

SABU, A. Sources, Properties and Applications of Microbial Therapeutic Enzymes. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 334–341, 2003.

SARAMAGO, S. P. *et al.* Planejamento de experimentos e otimização de sistemas mistos. **FAMAR em Revista**, v. 11, n. January, p. 231–245, 2008.

SINGH, P.; KUMAR, S. Chapter 2 - Microbial Enzyme in Food Biotechnology. **Enzymes in Food Biotechnology**, p. 19–28, 2019.

SINGH, R.; SINGH, A.; SACHAN, S. Chapter 48 - Enzymes Used in the Food Industry: Friends or Foes? *In*: KUDDUS, M. (Ed.). . **Enzymes in Food Biotechnology**. 1^a ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. p. 827–843.

VIVIJS, B. *et al.* 2,3-Butanediol fermentation promotes growth of *Serratia plymuthica* at low pH but not survival of extreme acid challenge. **International Journal of Food Microbiology**, v. 175, p. 36–44, 2014.

WESTERS, L.; WESTERS, H.; QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1694, n. 1–3, p. 299–

310, 11 nov. 2004.

ZHOU, Y. *et al.* Effects of agitation, aeration and temperature on production of a novel glycoprotein gp-1 by streptomyces kanasenisi zx01 and scale-up based on volumetric oxygen transfer coefficient. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2018.