
Produção de enzimas de interesse biotecnológico por nova cepa de

Paecilomyces dactylethromorphus

Production of enzymes of biotechnological interest by a new strain of

Paecilomyces dactylethromorphus

Rafaela Cabestré¹, Débora de O. Losnak², Danielle Hamae Yamauchi³, Hans Garcia Garces³,
Virginia B. Richini-Pereira⁴, Luciana S. Ruiz⁴, Geisiany M. Queiroz-Fernandes^{5*}

¹Centro Universitário Sagrado Coração, Bauru, São Paulo, Brasil; ²Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina de Botucatu, Doenças Tropicais, Botucatu, São Paulo, Brasil; ³Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Botucatu, Brasil; ⁴Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais II - Bauru, Núcleo de Ciências Biomédicas, Bauru, Brasil; ⁵São Leopoldo Mandic- Faculdade de Medicina de Araras, São Paulo, Brasil.

*Autor correspondente: Geisiany Maria de Queiroz-Fernandes, Faculdade São Leopoldo Mandic, Araras, São Paulo, Brazil - E-mail: geisyq@gmail.com

Recebido: 29/11/2020; Aceito: 29/12/2020

RESUMO

Os fungos são fontes importantes para a obtenção de enzimas biotecnológicas. Portanto, este estudo teve como objetivo bioprospectar fungos filamentosos capazes de produzir as enzimas proteases, celulasas e xilanases. Inicialmente, isolaram-se os fungos de lodo ativado residual, fornecido por uma indústria de celulose, através de técnicas microbiológicas tradicionais. Em seguida, realizou-se a produção enzimática empregando fermentação líquida submersa, em condições de cultura descritas na literatura. A cepa identificada como CCI-1 foi a que demonstrou maior capacidade de secretar enzimas de interesse, principalmente proteases (3256,5 U mg⁻¹). Por isso, foi identificada por características macroscópicas, microscópicas e análises moleculares, utilizando iniciadores das regiões D1/D2 e ITS, seguidos por sequenciamento genético. Identificou-se a nova cepa como *Paecilomyces dactylethromorphus*, um agente biotecnológico promissor, que poderá ser utilizada para obtenção de outros produtos de valor agregado.

Palavras-chave: Celulase, Fungo filamentoso, Protease, Sequenciamento, Xilanase.

ABSTRACT

Fungi are important sources for obtaining biotechnological enzymes. Therefore, this study has as objective a bioprospect filamentous fungi capable of producing the enzymes proteases, cellulases and xylanases. Initially, residual activated sludge fungi, isolated from a cellulose industry, were isolated using traditional microbiological techniques. Then, enzymatic production was carried out using submerged liquid fermentation, under culture conditions described in the literature. The strain identified as CCI-1 showed the greatest capacity to secrete enzymes of interest, principally proteases (3256.5 U/mg). Therefore, it was identified by macroscopic,

microscopic and molecular analysis characteristics, using primers from the D1/D2 and ITS regions, followed by genetic sequencing. The new strain was identified as *Paecilomyces dactylethromorphus*, a promising biotechnological agent, which can be used to obtain other value-added products.

Keywords: Cellulase, Filamentous fungus, Protease, Sequencing, Xylanase.

INTRODUÇÃO

O tratamento de resíduos agroindustriais, mediado por micro-organismos, ocorre pela remoção de compostos tóxicos que formam no final o chamado lodo ativado residual. Nessas estações de tratamento, ocorre a oxidação bioquímica de compostos inorgânicos e orgânicos, que são submetidos ao sistema durante o descanso aeróbico (BENTO et al., 2005). Acredita-se que, após a remoção desses compostos poluentes, micro-organismos residuais com características metabólicas interessantes permaneçam no lodo ativado, pois, o contato com substâncias tóxicas pode favorecer a ocorrência de alterações genéticas durante o processo, gerando mudanças positivas, sob o ponto de vista biotecnológico, em suas rotas bioquímicas (PEREIRA et al., 2012).

Os fungos filamentosos são os principais produtores de enzimas com interesse industrial. *Paecilomyces* sp. é um gênero de fungos que apresentam hifas hialinas a amareladas, septadas ou lisas, conidióforos irregulares ramificados, capazes de produzir conídios hialinos unicelulares em cadeias basipetais (MOREIRA et al., 2018). A observação dessas características morfológicas é essencial para a identificação das espécies fúngicas, além disso, técnicas de identificação biomolecular também são importantes. As espécies mais isoladas em diferentes ecossistemas são conhecidas por *P. variotii*, *P. formosus* e *P. dactylethromorphus* (HOUBRAKEN et al., 2010).

Paecilomyces sp. é descrito como um fungo de grande importância na obtenção de enzimas, como as proteases (FAN et al., 2012), xilanases, celulase (BALA e SINGH, 2018), tanases, fitases, quitinases, amilases e pectinases (LAGUNA et al., 2015). Ademais, sua aplicação foi descrita para aplicação no biocontrole de nematoides (LI et al., 2018) e na degradação de plásticos biodegradáveis (ACHARYA e CHAUDHARY, 2012).

Os avanços biotecnológicos favoreceram a substituição de processos químicos industriais por biocatalisadores enzimáticos, contribuindo para a redução de danos ambientais, devido ao uso de catalisadores não tóxicos e biodegradáveis. Dentre esses biocatalisadores, podem ser citadas as enzimas que transformam um substrato em um produto de interesse, acelerando o processo devido a redução da energia de ativação (ACHARYA e CHAUDHARY, 2012). Entre as enzimas biotecnológicas mais utilizadas em diferentes setores estão as proteases, celulasas e xilanases.

As proteases são capazes de hidrolisar e clivar as ligações peptídicas (HSIAO et al., 2014). Sabe-se que as proteases microbionas são importantes em diversos setores industriais, principalmente as proteases fúngicas, que se destacam devido a alta atividade e estabilidade em ambientes ácidos (HSIAO et al., 2014). Essa enzima fúngica pode ser empregada em processamento de alimentos, coagulantes de leite e aditivos alimentares que melhoram o sabor e a textura (HSIAO et al., 2014), além de ser utilizada na indústria do couro, substituindo sulfetos e detergentes, a altas temperaturas e ainda na síntese de novos medicamentos (ACHARYA e CHAUDHARY, 2012).

As celulasas são capazes de hidrolisar as ligações glicosídicas, atuando na degradação da celulose, através da conversão do açúcar em etanol e outros combustíveis, e assim contriui para a obtenção de energia renovável e na redução da poluição ambiental. Também são utilizados como biocatalisadores em diversas áreas industriais, como nas indústrias têxtil e de papel, por exemplo. Na indústria de alimentos, são utilizadas como aditivo enzimático, com a principal característica de nelhorar a utilização de nutrientes na alimentação animal

(KUHAD et al., 2011). Aliado a isso, tornaram-se importantes ferramentas biotecnológicas, pois, geralmente possuem alta estabilidade proteica e atividade enzimática em temperaturas variadas (PRASANA et al., 2016).

As xilanases podem ser usadas para fins industriais ou para a melhoria da saúde humana e animal. Os oligossacarídeos produzidos pela ação das xilanases são utilizados como aditivos alimentares, com a finalidade de estimular o crescimento ou a atividade dos micro-organismos da microbiota (FALCK et al., 2013), sendo também utilizadas na degradação do xilano (HATANAKA et al., 2011), além do seu papel na indústria de celulose, atuando no branqueamento (GOLUGURI, 2012). Por serem enzimas hidrolíticas da hemicelulose, as xilanases são uma alternativa ao uso de compostos tóxicos clorados, com potencialidade na redução da poluição e melhoria na qualidade da celulose produzida (WALIA et al., 2017).

Nesse contexto, este estudo teve como objetivo bioprospectar, em lodo ativado residual, fungos filamentosos capazes de produzir as enzimas proteases, celulasas e xilanases. E, através desses, contribuir para os avanços tecnológicos em diferentes segmentos industriais, que colaborem com a melhoria da saúde humana e animal, além de favorecer a obtenção de produtos biotecnológicos sustentáveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Bioprospecção

As cepas fúngicas foram isoladas de lodo ativado residual, recuperado em uma estação de tratamento de celulose de Lençóis Paulista/SP, Brasil, no segundo semestre de 2016. A amostra de lodo foi homogeneizada, pesada (1g) e diluída em solução fisiológica estéril 1:10, 1:100 e 1:1000. Em seguida, com o auxílio de uma alça de Drigalski, 1 mL das soluções diluídas foram inoculadas e semeadas no meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol. As placas de 90mm x 15mm foram incubadas em estufa microbiológica a 28°C até o surgimento das primeiras colônias. A cada observação do crescimento de uma nova colônia com macroscopia distinta, uma coleta, com auxílio de agulha microbiológica, era realizada e transferida para outras placas contendo meio, até que, ao final, foram obtidas culturas puras (PRADE et al., 2007). Dezesete colônias foram inicialmente isoladas e avaliadas quanto à sua capacidade de produzir proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A colônia que produziu a maior concentração de proteínas foi identificada com o código CCI 1, sendo está analisada quanto às suas características macroscópicas e microscópicas (exame direto e microcultivo) (SIDRIM et al., 2012). A análise molecular dessa colônia consistiu na extração do DNA fúngico cultivado por 7 dias em ágar Sabouraud Dextrose a 28 °C, utilizando a técnica Quick CTAB modificada (ZHANG et al., 2015). A amostra foi macerada com nitrogênio líquido, transferida para um microtubo contendo glass beads (Sigma Life Science 425-600 µm), adicionado 980 µL de tampão de extração (100 mM Tris-HCL com pH 8, 1.4 M Cloreto de sódio, 30 mM EDTA, 2% CTAB e 2% Mercaptoetanol) e homogeneizado no equipamento Precellys (Bertin Technologies, MD, EUA) para ruptura das células fúngicas.

A quantificação e análise da pureza do DNA foi realizada no equipamento NanoVue (GE Healthcare, USA). As reações de PCR foram realizadas com a GoTaq®Green Master Mix (Promega, Madison, USA), com volume total de 25 µL, contendo 3 µL de DNA genômico e 0,5µM de cada primer. Para a região ITS, foram utilizados os primers ITS1 (5'-TCCGTCGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990) e para a região D1/D2 os primers NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')/NL4(5'- GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (VILELA et al., 2005).

Foi utilizado como controle positivo o DNA de *Paracoccidioides* sp. e como controle negativo não houve adição de DNA. As condições de amplificação foram: para os primers ITS1 e ITS4 o ciclo foi de 5

minutos a 94 °C, 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 55 °C e 1 minuto a 72 °C; para os primers NL1 e NL4 o ciclo foi de 2 minutos a 95 °C, 45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C, 45 segundos a 72 °C e 5 minutos a 72 °C, e ambos reiniciando o ciclo até obter 40 ciclos completos (ZHANG et al., 2015). A visualização do material amplificado foi realizada por corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% adicionado de 0,1 µL/mL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen). O gel foi visualizado em transluminador de luz UV (Tlum Compact Syngene). Para o sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático de DNA Modelo ABI 3500 (Applied Biosystems) seguindo a metodologia de Sanger (IBTEC, 2018). As sequências obtidas foram visualizadas sob a forma de eletroferograma, alinhadas pelo programa MEGA X (KUMAR et al., 2018) e submetidas ao BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

Produção de enzimas

Todas as produções enzimáticas foram realizadas na concentração de 10^7 esporos mL⁻¹, cuja padronização foi realizada pela contagem em câmara de Neubauer. Empregou-se fermentação líquida submersa (SmF) em Erlenmeyer de 250 mL, em agitador orbital e, para cada enzima, foram empregados meios de cultura e condições de cultivo específicos.

A produção de protease foi realizada utilizando-se o meio de cultura e as condições de cultivo descrito por Rao et al. (2006), com modificações. O meio foi constituído de 30 g glicose, 10 g peptona suplementado com 10 g de extrato de levedura, 6 g de farinha de soja, 1,9 g sacarose, 5 g de caseína (g.L⁻¹). O pH inicial do meio foi ajustado para 7,0, a fermentação foi incubada durante 7 dias sob agitação de 150 rpm a 28 °C.

Para a produção de celulase, o meio empregado foi o descrito por Nair et al. (2008), com modificação. O meio consistia em 0,5 KCl; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂HPO₄ 2,5; NaH₂PO₄ 0,5; CaCl₂.2H₂O 0,01; FeSO₄.7H₂O 0,01; ZnSO₄.7H₂O 0,002 e 0,5 carboximetilcelulose (g.L⁻¹). A produção foi realizada por 7 dias, com o pH inicial ajustado para 6,0, sob 100 rpm a 30 °C.

A xilanase foi produzida utilizando o meio de cultura e as condições de cultura descritas por Nair et al. (2008), com modificação. O meio consistia em 0,5 KCl; MgSO₄.7H₂O 0,5; (NH₄)₂HPO₄ 2,5; NaH₂PO₄ 0,5; CaCl₂.2H₂O 0,01; FeSO₄.7H₂O 0,01; ZnSO₄.7H₂O 0,002 e xilano 0,5 (g.L⁻¹). A produção foi realizada por 7 dias, com o pH inicial ajustado para 6,0, sob 100 rpm a 30 °C.

Determinação da concentração de proteínas

Após a produção, o extrato enzimático foi recuperado por filtração a vácuo em papel de filtro de 0,45 µm. Foram adicionados 50 µL de extrato e 1,5 mL de reagente de Bradford adquirido comercialmente aos tubos de ensaio. Esta mistura foi mantida por 5 minutos em temperatura ambiente e lida a 595 nm em um espectrofotômetro, zerando o branco da reação com 1,5 mL de reagente de Bradford e 50 mL de água destilada. As proteínas foram quantificadas usando uma curva analítica de albumina de soro bovino como padrão (BRADFORD, 1976).

Quantificação da atividade enzimática

A quantificação da atividade proteolítica foi realizada segundo método descrito previamente, utilizando caseína como substrato: 250 µL do extrato enzimático foi adicionado em um tubo contendo 1,5 mL da solução do substrato (0,6% de caseína em 0,1 M em tampão TrisHCl pH 8,0) e incubados a 37 °C durante 20 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de TCA e em seguida esta reação foi centrifugada, durante 1 minuto a 4000 rpm. A absorbância do filtrado foi medida em 320 nm contra o branco preparado conforme a reação da amostra, exceto pela adição do extrato enzimático previamente desnaturado durante 15 minutos a 100

°C. Uma unidade de atividade de enzima foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de tirosina por minuto conforme as condições experimentais (MAHANTA et al., 2008).

A atividade da celulase (CMCase) foi realizada na presença de carboximetilcelulose preparada a 2% em tampão citrato 0,5 M (pH 4,8) e 500 μL do extrato enzimático bruto foram adicionados a 500 μL do referido substrato, como descrito acima (CUNHA et al., 2012). As soluções foram incubadas a 50 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida com o mesmo volume de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Em seguida, o conteúdo foi fervido por 5 min. Após o arrefecimento, a leitura foi realizada a 540 nm. Uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima que liberava 1 μmol de glicose por minuto, de acordo com as condições experimentais.

A atividade xilanásica foi determinada utilizando como substrato a xilana. Foram acrescentados a 900 μL de xilana a 1% em tampão citrato de sódio (50mM e pH 5,3) 100 μL do extrato enzimático. A reação foi incubada a 50 °C durante 5 min. Após este período foi adicionado 1,0 mL de DNS e a reação passou por fervura a 100°C durante 5 min. Após arrefecimento a leitura foi realizada a 540 nm em espectrofotômetro. Uma unidade de xilanase foi definida como a quantidade de enzima que liberou 1 μmol de xilose por minuto conforme as condições experimentais (NAIR et al., 2008).

Análises Estatísticas

Todos os ensaios para a análise da concentração de proteínas e da atividade enzimática foram realizados em triplicatas, determinando-se a média e o desvio padrão dos resultados.

RESULTADOS

As etapas de isolamento e identificação microbiológica mostraram achados patognomônicos indicativos do gênero *Paecilomyces* spp. A colônia apresentou coloração castanha-clara-esverdeada, com aspecto pulverulento (Figura 1A). Na microscopia, por exame direto (Figura 1B) e após microcultivo (Figura C), apresentou hifas hialinas septadas, conídios unicelulares em cadeias, ovóides, formados em filetos de base ampla e pescoço longo e fino no final, eram ramificados irregularmente (Figura 1B) (ORLANDELLI et al., 2012).

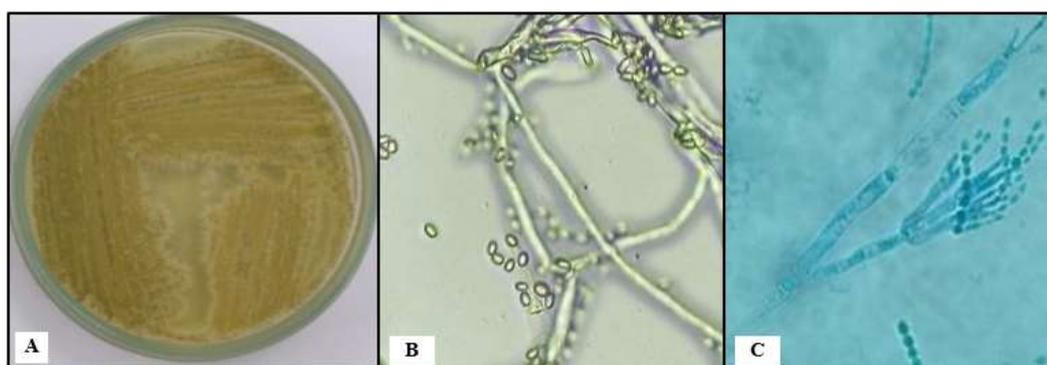


Figura 1. Achados patognomônicos observados em cultura em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol, observação em exame direto (40x) e após microcultivo (40x) da colônia CCI 1, indicativos do gênero *Paecilomyces* spp.

A caracterização microbiológica foi realizada juntamente com o sequenciamento de ITS (ZAWADNEAK et al., 2015), por meio do estudo das regiões ITS e D1/D2 (Figura 2). O fungo foi identificado

como *Paecilomyces dactylethromorphus* e as sequências de DNA foram depositadas no GenBank sob o número de acesso MK782976 (região D1/D2).



Figura 2. Eletroforese com os primers ITS1/ITS4 representados de 1 a 4, sendo que 1 e 2 equivalem a amostra, 3 foi adicionado o controle positivo e 4 o controle negativo. Os primers D1/D2 estão representados de 5 a 8, sendo que 5 e 6 equivalem a amostra, 7 foi adicionado o controle positivo e 8 o controle negativo.

Os resultados presentes na Tabela 1 mostram a determinação da concentração de proteínas e quantificação da atividade enzimática. Demonstrando que a espécie fúngica *P. dactylethromorphus* produziu as três enzimas com boa atividade específica, com destaque para a protease.

Tabela 1. Determinação da concentração de proteínas e atividade das enzimas produzidas por *P. dactylethromorphus*.

Enzimas	Concentração de Proteínas (mg mL ⁻¹)	Atividade Enzimática (U mL ⁻¹)	Atividade Específica (U mg ⁻¹)*
Celulase	0,044	0,011	0,249±0,06
Protease	0,023	74,9	3256,5±0,01
Xilanase	0,031	0,069	2,240±0,07

*média e desvio padrão obtida a partir de ensaios realizados em triplicatas

DISCUSSÃO

Micro-organismos podem ser utilizados em diferentes segmentos biotecnológicos como em processos de biorremediação ambiental e controle biológico. Porém, a área de maior utilização é a produção enzimática, que é melhorada cada vez mais pela otimização de processos industriais e pela bioprospecção de micro-organismos com novas características metabólicas, havendo assim a possibilidade de diminuição dos custos operacionais e a geração de um aumento na qualidade dos serviços (HOUBRAKEN e SAMLON, 2011).

Estudos prévios apontaram que a utilização de micro-organismos isolados do solo vem mostrando grande potencial biotecnológico para a produção de enzimas, uma vez que estes apresentam biogeoquímica particular tornando-os diferenciados (THANKAPPAN et al., 2018). Outra contribuição biotecnológica obtida a partir de bioprospecção em solo foi a descoberta de micro-organismos, principalmente fungos do gênero *Aspergillus* sp., produtores de lovastatina, um antioxidante aplicado no tratamento de neoplasias (BALRAJ et al., 2018).

Fungos isolados do ar, água, solo ou de outros ecossistemas podem possuir características biotecnológicas importantes, sendo que 7% destes, correspondem ao fungo filamentoso do gênero *Paecilomyces* (SOBRAL et al., 2017). A nova linhagem *P. dactylethromorphus* descrita neste estudo, refere-se ao primeiro

fungo desta espécie isolado a partir de lodo ativado residual proveniente do tratamento de resíduos agroindustriais da indústria de celulose (HOUBRAKEN e SAMLON, 2011).

Dentre as análises taxonômicas presentes na literatura, a espécie fúngica *P. dactylethromorphus* é anamorfa do complexo de espécies de *Paecilomyces variotii* (SAMSON et al., 2009; HOUBRAKEN et al., 2010; HEIDARIA et al., 2018). Além disso, de acordo com Zawadneak et al. (2015) deve-se considerar a taxonomia anamorfa como *Byssochlamys* sp. gerando padrões gênicos parecidos entre eles, principalmente na análise da sequência de ITS, e consequentemente de suas propriedades bioquímicas na produção enzimática.

Algumas cepas de *Paecilomyces* spp. e suas formas anamorfias foram avaliadas quanto à sua capacidade de produzir enzimas, mostrando importante potencial na síntese de amilases, pectinases, xilanases e celulases (LAGUNA et al., 2015). E, também são utilizados na produção de substâncias antibacterianas (ZHANG et al., 2016).

Lopes et al. (2016) observaram a ocorrência do gênero *Paecilomyces* spp. no Brasil, sendo que o isolado *P. saturatus* demonstrou ser uma importante fonte de obtenção enzimática, em especial, de celulase e xilanase, que foram aplicadas na produção de bioetanol. Além disso, o *P. variotii*, uma das formas anamorfa de *P. dactylethromorphus*, foi considerado um micro-organismo com ótimas características biotecnológicas, sendo capaz de secretar celulase, xilanase (BALA e SINGH, 2018), tanases, fitases, quitinases, amilases e pectinases (LAGUNA et al., 2015).

A produção de proteases por *Paecilomyces* spp. é estudada com frequência (SHARMA et al., 2014; FAN et al., 2012) e dados semelhantes aos obtidos neste estudo (Tabela 1) foram observados (46 U/mL e 85.3 U mL⁻¹), após produção por fermentação submersa (SHARMA et al., 2014). Além disso, a produção enzimática pode ser diferenciada dependendo das espécies de *Paecilomyces* sp., por exemplo, a espécie *P. variotii* não é considerada um bom produtor de proteases, lipases e amilases, enquanto a utilizada neste estudo produziu a enzima protease com boa atividade específica (ORLANDELLI et al., 2012).

P. variotii isolado do solo foi descrito como produtor de protease com atividade enzimática de 82,5 U mL⁻¹ acima do observado nesse estudo (74,9 U mL⁻¹), entretanto os autores utilizaram condições diferentes de produção como pH 7,5, temperatura 37 °C e tempo de produção de 10 minutos (BINH et al., 2019). Em outro estudo foi descrita a produção de protease por esse mesmo micro-organismo, porém com atividade enzimática abaixo da observada neste estudo (53 U mL⁻¹), neste caso foram utilizadas como condições de produção pH 4,5, temperatura de 30 °C, com duração de 5 dias (DEORE et al., 2013).

Além disso, celulases produzidas por outra linhagem de *Paecilomyces* sp. mostrou atividade específica igual a 1,8 U mg⁻¹ utilizando como substrato CMCCase (TEIXEIRA et al., 2013). No estudo realizado por Marques et al. (2018) os autores notaram que a otimização do processo de produção enzimática alterou a qualidade e quantidade de celulase produzida pelo gênero *Paecilomyces* sp., aumentando a atividade desta enzima em 4 vezes. Assim, pode-se propor que processos de otimização da produção poderiam favorecer também a produção pelo fungo utilizado neste estudo. *P. variotii* não é considerado um bom produtor de celulase devido a sua baixa atividade enzimática de 0,077 U mL⁻¹, a sua produção foi realizada com CMCCase como substrato e utilizando temperatura de 28-30 °C (PRIYANKA et al., 2017) assim como também observado neste estudo (0,011 U mL⁻¹).

No estudo desenvolvido por Marques et al. (2018) uma cepa de *Paecilomyces* sp. mostrou capacidade de produzir xilanase com atividade específica igual a 0,008 U mg⁻¹, bem abaixo da encontrada neste estudo (Tabela 1), enquanto outro estudo observou atividade específica da xilanase de 706,1 U mg⁻¹. Sugere-se que as diferentes linhagens fúngicas, com suas particularidades metabólicas, bem como os substratos utilizados para determinar a atividade dessas enzimas nos diferentes estudos e etapas de purificação, contribuam para a

observação desses dados (MARQUES et al., 2018; SHARMA et al., 2014; FAN et al., 2012), o que leva a grande variedade de dados descritos na literatura.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as técnicas microbiológicas e moleculares de bioprospecção permitiram isolar e identificar o fungo *P. dactylethromorphus* a partir de lodo ativado residual e que essa nova cepa é biotecnologicamente interessante, devido à sua capacidade metabólica de produzir enzimas, principalmente proteases, podendo contribuir para a obtenção de produtos biotecnológicos de interesse comercial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2017/13497-1) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ACHARYA, S.; CHAUDHARY, A. Bioprospecting thermophiles for cellulase production: a review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.43, n.3, p.844-856. 2012.
- BALA, A.; SINGH, B. Cellulolytic and xylanolytic enzymes of thermophiles for the production of renewable biofuels, **Renewable Energy**, v.136, p.1231-1244, 2018.
- BALRAJ, J.; JAIRAMAN, K.; KALIESWARAN, V.; JAYARAMAN, A. Bioprospecting lovastatin production from a novel producer *Cunninghamella blakesleeana*. **3 Biotech**, v.8, n.8, p.359, 2018.
- BENTO, A.P.; SEZERINO, P.H.; PHILIPPI, L.S.; REGINATTO, V.; LAPOLLI, F.B. Caracterização da Microfauna em Estação de Tratamento de Esgotos do Tipo Lodos Ativos: Um instrumento de Avaliação e Controle do Processo. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.10, n.4, p.329-338, 2005.
- BINH, C.T.; TUAN, T.V.; TRAM, T.B.; HA, B.T.V. Determination of protease and chitinase activities from *Paecilomyces variotii* NV01 isolated from Dak Lak pepper soil. **Vietnam Journal of Science Technology and Engineering**, v.61, n.4, p.58-63, 2019.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram. **Analytical Biochemistry**, v.72, n.1-2, p.248-254, 1976.
- CUNHA, F.M.; ESPERANCA, M.N.; ZANGIROLAMI, T.C.; BADINO, A.C.; FARINAS, C.S. Sequential solid-state and submerged cultivation of *Aspergillus niger* on sugarcane bagasse for the production of cellulase. **Biorese Technol**, v.112, p.270-274, 2012.
- DEORE, G.B.; LIMAYE, A.S.; DUSHING, Y.A.; DHOBAL, S.B.; KALE, S.; LAWARE, S.L. Screening of Protease Producing Fungi for Microbial Digestion of Seed Proteins and synthesis of Amino Acids-metalnutrient Chelates. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.16, n.2, p.86-91, 2013.

FALCK, P.; PRECHA-ATSAWANAN, S.; GREY, C.; IMMERZEEL, H.; STALBRAND, H.; ADLERCREUTZ, P.; KARLSSON, E.N. Xylooligosaccharides from Hardwood and Cereal Xylans Produced by a Thermostable Xylanase as Carbon Sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.7333–7340, 2013.

FAN, G.; KATROLIA, P.; JIA, H.; YANG, S.; YAN, Q.; JIANG, Z. High-level expression of a xylanase gene from the thermophilic fungus *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*. **Biotechnology Letters**, v.34, n.11, p. 2043-2048, 2012.

GOLUGURI, B. R., THULLURI, C., CHERUPALLY, M.; ACHUTHANANDA, N.N.; MANGAMURI, L.N. Potential of Thermo and Alkali Stable Xylanases from *Thielaviopsis basicola* (MTCC-1467) in Biobleaching of Wood Kraft Pulp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.67, p.2369–2380, 2012.

HATANAKA, K. Incorporation of Fluorous Glycosides to Cell Membrane and Saccharide Chain Elongation by Cellular Enzymes. **Topics in Current Chemistry**, v.308, n.291, p.291-306, 2011.

HEIDARIA, R.; FOTOUHIFAR, K.; DEBET, A.J.M.; AANEN, D.K. Phylogeny of *Paecilomyces*, the causal agent of pistachio and some other trees dieback disease in Iran. **PLoS ONE**, v.13, n.7., p.1-14, 2018.

HOUBRAKEN, J.; SAMSON, R. A. Phylogeny of *Penicillium* and the segregation of *Trichocomaceae* into three families. **Studies in Mycology**, v.70, n.1, p.1-51, 2011.

HOUBRAKEN, J.; VERWEIJ, P.E.; RIJS, A.J.M.M.; BORMAN, A.M.; SAMSON, R.A. Identification of *Paecilomyces variotii* in Clinical Samples and Settings. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.8, p.2754-2761, 2010.

HSIAO, N.; CHENB, Y.; KUANB, Y.; LEE, Y.; LEE, S.; CHAN, H.; KAO, C. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.17, n.2, p.89-94, 2014.

IBTEC. Instituto de Biotecnologia. **Sequenciamento Sanger**. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu. 2018. Disponível em: <http://www.ibtec.unesp.br/#!/servicos/sequenciamento-sanger/>. Acessado em: 31 dez 2020.

KUHAD, R. C.; GUPTA, R.; SINGH, A. Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. **Enzyme Research**, v. 2011, p.1-10, 2011.

KUMAR, S.; STECHER, G.; LI, M.; KNYAZ, C.; TAMURA, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution**, v.35, p.1547-1549, 2018.

LAGUNA, I.H.B.; MARANTE, F.J.T.; MIOSO, R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, n.6, p.1455-66, 2015.

LI, F.; GUO, Z.; WANG, N.; XIA, H.; LIU, D.; CHEN, S. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate)-derived polymers with different 4-hydroxybutyrate fractions by a novel depolymerase from *Paecilomyces* sp. 1407. **Polymer Degradation and Stability**, v.159, p.107-115, 2018.

LOPES, A.M.; VITORINO, L.C.; CASTRO, C.F.S.; NASCIMENTO, J.; SOUCHIE, E. Primeiro relato da ocorrência de *Paecilomyces formosus* e *Paecilomyces parvisporus* no Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.14, n.4, p.215-224, 2016.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S.K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid-state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, v.99, n.6, p.1729-1735, 2008.

MARQUES, N.P.; OEREIRA, J.C.; GOMES, E.; SILVA, R.; ARAUJO, A.R.; FERREIRA, H.; RODRIGUESE, A.; DUSSANA, K.J.; BOCCHINIA, D.A. Cellulases and xylanases production by endophytic fungi by solid state fermentation using lignocellulosic substrates and enzymatic saccharification of pretreated sugarcane bagasse. **Industrial Crops & Products**, v.122, p.66–75, 2018.

MOREIRA, D.C.; OLIVEIRA, M.M.E.; BORBA, C.M. Human Pathogenic *Paecilomyces* from Food. **Microorganisms**, v.6, n.3, 2018.

NAIR, S.G.; SINDHU, R.; SHANKAR, S. Fungal xylanase production under solid state and submerged fermentation conditions. **African Journal of Microbiology Research**, v.2, p.82-86, 2008.

ORLANDELLI, R.C.; SPECIAN, V.; FELBER, A.C. Enzimas de interesse industrial: Produção por fungos e aplicações. SaBios: **Revista de Saúde e Biologia**, v.7, n.3, p.97-109, 2012.

PEREIRA, A.R.B.; FREITAS, D.A.F. Uso de Microorganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.6, n.6, p.975-1006, 2012.

PRADE, C.A.; MATSUMUTA, A.T.; OTT, A.P.; PORTO, M.L. Diversidade de fungos do solo em sistemas agroflorestais de citrus com diferentes tipos de manejo no município de Roca Sales, Rio Grande do Sul, Brasil. **Biociências**, v.15, n.1, p.73-81, 2007.

PRASANNA, H.N.; RAMANJANEYULU, G.; REDDY, B.R. Optimization of cellulase production by *Penicillium* sp. **3 Biotech**, p.1-11, 2016.

PRIYANKA, P.; YUVRAJ, C.; FARHA, S.; ARANGANATHAN, V. Isolation of Cellulose degrading fungi from soil and optimization for Cellulase production using carboxy methyl cellulose. **International Journal of Life Science e Pharma Research**, v.7, 2017.

RAO, Y.K.; SHIH-CHIN, L.; BING-LAN, L.; YEW-MIN, T. Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, n.2, p.57-66, 2006.

SAMSON, R.A.; HOUBRAKEN, J.; VARGA, J.; FRISVAD, J.C. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssosclamyces* and its *Paecilomyces* anamorphs. **Persoonia**, v.22, p.14-27, 2009.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; YADAV, S.; NAIK, S. N. Role of Karanja deoiled cake based medium in production of protease and fatty acids by *Paecilomyces lilacinus* 6029. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.118, n.3, p.270-271, 2014.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

SOBRAL, L. V.; MELO, K. N.; SOUZA, C. M.; SILVA, S.F.; SILVA, G.L.R.; SILVA, A.L.F.; WANDERLEY, K.A.A.; OLIVEIRA, I.S.; CRUZ, R. Antimicrobial and enzymatic activity of anemophilous fungi of a public university in Brazil. **Academia Brasileira de Ciências**, v.89, n.3, p.2327-2340, 2017.

TEIXEIRA, C.B.; MACEDO, G.A.; MACEDO, J.A.; SILVA, L.H.M.; RODRIGUES, A.M.C. Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology**, v.129, p.575-581, 2013.

THANKAPPAN, S.; KANDASAMY, S.; JOSHI, B.; SOROKINA, K.N.; TARAN, O.P.; UTHANDI, S. Bioprospecting thermophilic glycosyl hydrolases, from hot springs of Himachal Pradesh, for biomass valorization. **AMB Express**, v.8, n 1, p.168, 2018.

VILELA, R.; MENDONZA, L.; ROSA, P.S.; BELONE, A.F.F.; MADEIRA, S.; OPROMOLLA, D.V.A.; RESENDE, M.A. Molecular model for studying the uncultivated fungal pathogen *Lacazia loboi*. **Journal of Clinical, Microbiology**, v.43, n.8, 2005.

WALIA, A.; GULERIA, S.; MEHTA, P.; CHAUHAN, A.; PARKASH, J. Microbial xylanases and their industrial application in pulp and paper biobleaching: a review. **Biotech**, v.7, n.1, p.11. 2017.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.D.; LEE, S.; TAYLOR, J. Analysis of phylogenetic relationships by amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR- Protocols and Applications- A Laboratory Manual**, 1990, p. 315–322.

ZAWADNEAK, M.A.C.; PIMENTEL, I.C.; ROBL, D.; DALZOTO, P.; VICENTE, V.; SOSA-GOMEZ, D.R.; PORSANI, M.; CUQUEL, F.L. *Paecilomyces niveus* Stolk & Samson, 1971 (Ascomycota: Thermoascaceae) as a pathogen of *Nasonovia ribisnigri* (Mosley, 1841) (Hemiptera, Aphididae) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.75, n.4, p.158-162, 2015.

ZHANG, P.; LI, X.; MAO, X.; MANDI, A.; KURTAN, T.; WANG, B. Varioloid A, a new indolyl-6,10b-dihydro-5aH-[1]benzofuro[2,3-b]indole derivative from the marine alga-derived endophytic fungus *Paecilomyces variotii* EN-291. **Journal of Organic Chemistry**, v.12, p.2012-2018, 2016.

ZHANG, Y.; HAGEN, F.; STIELOW, B.; RODRIGUES, A.M.; SAMERPITAK, K.; ZHOU, X.; FENG, P.; YANG, L.; CHEN, M.; DENG, S.; LI, S.; LIAO, W.; LI, R.; LI, F.; MEIS, J.F.; GUARRO, J.; TEIXEIRA, M.; AL-ZHRANI, H.S.; PIRES DE CAMARGO, Z.; ZHANG, L.; DE HOOG, G.S. Phylogeography and evolutionary patterns in *Sporothrix* spanning more than 14 000 human and animal case reports. **Persoonia**, v.35, p.1-20, 2015.