

UNIVERSIDADE
CATÓLICA
DE PERNAMBUCO



**PRÓ-REITORIA ACADÊMICA
COORDENAÇÃO GERAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS AMBIENTAIS**

Marcelo de Andrade Silva

**Produção de proteases e biossurfactantes por
*Bacillus licheniformis***

Recife
2011

Marcelo de Andrade Silva

**Produção de proteases e biossurfactantes por
*Bacillus licheniformis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento em Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP como requisito para obtenção do título de **Mestre em Desenvolvimento de Processos Ambientais.**

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos Ambientais

Linha de Pesquisa: Tecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

Co-Orientadora: Profa. Dra. Leonie Asfora Sarubbo

Recife
2011

S586p

Silva, Marcelo de Andrade

Produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis* / Marcelo de Andrade Silva ; orientador Alexandra Amorim Salgueiro ; co-orientador Leonie Asfora Sarubbo, 2011.

xiii, 73 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Pernambuco. Pró-reitoria Acadêmica. Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais, 2011.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Biossurfactantes. 3. *Bacillus licheniformis*. 4. Resíduos industriais. 5. Cultura submersa. I. Título.

CDU 574.6

**Produção de proteases e biossurfactantes por
*Bacillus licheniformis***

Marcelo de Andrade Silva

Examinadores:

Prof^a. Dr^a Alexandra Amorim Salgueiro (Orientadora)
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Clarissa Daisy da Costa Albuquerque
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Defendida em 17 de março de 2011

Coordenadora: Prof^a. Dr^a. Alexandra Amorim Salgueiro

“Cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não havia pobreza no mundo e ninguém morreria de fome.”

Mahatma Gandhi

“Só quando a última árvore for derrubada, o último peixe for morto e o último rio for poluído é que o homem perceberá que não pode comer dinheiro.”

(Provérbio Indígena)

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo milagre da minha existência, pelos sinais de alerta, pela luz do divino espírito santo (sabedoria), por estar sempre guiando meus passos e dando permissão para que tudo de bom aconteça em minha vida.

A minha esposa Gilma e aos meus filhos Djamilla e Marcelo, por compreender minhas ausências e faltas e por estar sempre me dando motivação para prosseguir.

Ao meu pai Romildo Gomes da Silva (*In memorian*) e minha mãe Maria do Carmo de Andrade Silva, por todos os sacrifícios e ensinamentos.

Aos meus irmãos Antônio, Ione, Jorge e Renato (*In memorian*), por todos os momentos compartilhados.

Aos amigos “irmãos” Professora Sandra Maria do Nascimento, Juliana, Robson, Jane, Antônio, Joana, Sandra M. T. C, João Souza, Charles, Elias, Everaldo, Cleide e Joelma por estimular as minhas lutas e ficarem felizes com a minha felicidade.

Aos meus avós Jacó e Josefa (*in memorian*), meus tios José, Josefa e Rita (*in memorian*), Luiz, Margarida, Manoel, Nair, Pedro, e aos meus primos e sobrinhos como incentivo para que sonhem acordados e busquem a realização desses sonhos.

A minha Orientadora Professora Dra Alexandra Amorim Salgueiro pelas lições de competência, correção e humanidade.

A minha Co-orientadora Professora Dra Leonie Asfora Sarubbo pela ajuda.

Aos professores Carlos Alberto (por toda ajuda), Galba Campos Takaki, Clarissa (por todo incentivo), Roziana (pelo incentivo e amizade), Carrazzoni; funcionários e amigos Humberto, Sônia, André, Charles, Moacir, Nélia, Niceas, Alessandra, Sérgio e a todos professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Desenvolvimento de Processos Ambientais da Universidade Católica de Pernambuco.

Aos inesquecíveis professores(as) Glória, Luís Gonzaga, Matilde Oliveira, Lúcia Helena, José João Eufrásio, Mário Lira, Cacilda e a todos os professores, gestores e funcionários das escolas: Mascarenhas de Moraes, Estadual de Olinda,

Liceu de Artes e Ofícios, CIPAM, UFRPE e UNICAP pela contribuição ao meu crescimento.

A Adamares, Rosileide e Roberto por todo carinho, amizade e atenção que espero sempre corresponder.

Aos colegas de mestrado, doutorado e PIBIC, pelo convívio acadêmico e lições aprendidas: Carlos, João, Amanda, Jaceline, Alex, Ladiel, Cláudia, Myrtes, Gustavo, Romualdo, Carol, Caitano, Paula, Rita, Jupiranã, Maria Helena, Alicia Antônio, Ednaldo, Adriana, Marta, Clarissa, Anabele, Fabíola, Raquel, Patrícia, Aline, Juliana, Priscila, Maria Luísa, Bárbara, Carla, Amanda, Mayara, Geovani, Elaine.

Aos eternos amigos de infância, trabalho e profissão e aos meus alunos.

Aos médicos Fabian, Delmiro, Maria de Fátima Monteiro e toda equipe do hospital UNICORDIS.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização deste sonho.

RESUMO

A produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis* UCP-1014 foi investigada neste trabalho. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 125 mL, em triplicata, inóculo 10% v/v, a 150 rpm e 37°C. Um planejamento fatorial foi realizado para investigar as concentrações dos componentes do meio de cultivo. Amostras de líquido metabólico foram coletadas, centrifugadas e os sobrenadantes utilizados para determinar pH, atividade proteolítica e tensão superficial. O líquido metabólico foi concentrado por ultrafiltração e a estabilidade da atividade proteolítica no retentado foi determinada quanto ao pH e à temperatura. A estabilidade do retentado foi investigada por planejamento fatorial e a atividade proteolítica determinada com 10, 20 e 30 dias de armazenamento a 28 °C. A determinação de proteases foi realizada na presença de azo-caseína. A cultura de *B. licheniformis* UCP-1014 produziu 112 U/mL de proteases na presença de melão 1% e uréia 0,5%, a pH 7,5 com 24 h de cultivo. A redução da tensão superficial do líquido metabólico não foi significativa nessas condições de trabalho. O líquido metabólico concentrado reteve cerca de 50% da atividade proteolítica inicial. O concentrado de proteases apresentou a maior atividade enzimática em pH 8 durante 30 min de incubação, retendo 97 % da atividade; a estabilidade térmica máxima foi a 50°C durante 30 min, retendo 98 % da atividade enzimática. O retentado do líquido metabólico após formulado manteve 54 % da atividade com 30 dias de armazenamento a 28°C. Proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de nutrientes de baixo custo podem ser competitivas no mercado.

Palavras-Chave: enzimas proteolíticas, biossurfactantes, *Bacillus licheniformis*, resíduos industriais, cultivo submerso

ABSTRACT

The production of protease and biosurfactant by *Bacillus licheniformis* UCP-1014 was investigated in this work. The experiments were performed in Erlenmeyer flasks, in triplicate, and inoculum 10% v/v, 150 rpm and 37°C. A factorial design was conducted to investigate the concentrations of the medium. Metabolic fluid samples were collected, centrifuged and the supernatant used to determine pH, proteolytic activity and surface tension. The liquid was concentrated by ultrafiltration metabolic the stability and proteolytic activity in the retentate was determined for pH and temperature. In making the retentate was used a factorial design, and protease stability was determined during 10, 20 and 30 days at 28°C. The determination of protease was performed in the presence of azo-casein. The culture of *B. licheniformis* UCP-1014 produced 112 U/mL protease in the presence of 1% molasses and urea 0,5%, pH 7,5 at 24h of culture. The reduction in surface tension was not significant in these metabolic conditions. The concentration of proteases produced by *B. licheniformis* UCP-1014 had the highest stability of enzyme activity in the absence of substrate at pH 7 during 60 min of incubation and maximum thermal stability between 40 – 90°C for 90 min. The liquid concentrate and formulated metabolic retained about 50% of proteolytic activity whose value decreased during storage at 28°C. Proteases produced by *B. licheniformis* UCP-1014 in the presence of nutrients of low cost can be competitive in the market.

Keywords: proteolytic enzymes, biosurfactant, *Bacillus licheniformis*, industrial waste, submerged cultivation

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease	21
Figura 2 Representação da alocação dos surfactantes na superfície de um líquido polar	26
Figura 3 Representação das forças eletrostáticas.....	26
Figura 4 Padrão de crescimento típico de uma cultura bacteriana em um sistema fechado	29
Figura 5 Representação de ultrafiltração por membrana filtrante.....	31

CAPÍTULO 2

Figura 1 Equipamento de ultrafiltração.....	47
Figura 2 Produção de proteases por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 em diferentes resíduos industriais	49
Figura 3 Valores de pH durante o cultivo submerso de <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 em diferentes resíduos industriais.....	50
Figura 4 Produção de proteases por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 na presença de melão e de diferentes fontes de nitrogênio.....	51
Figura 5 Valores de pH no cultivo submerso de <i>B. licheniformis</i> na presença de diferentes fontes de nitrogênio	52
Figura 6 Tensão superficial do biossurfactante obtido por cultivo submerso de <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 em presença de melão e diferentes fontes de nitrogênio..	54
Figura 7 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios em resposta da produção de proteases com 24 h de cultivo submerso do <i>Bacillus licheniformis</i> UCP-1014	57
Figura 8 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios em resposta da produção de proteases com 48 h de cultivo submerso do <i>Bacillus licheniformis</i> UCP-1014	58
Figura 9 Ultrafiltração do líquido metabólico de <i>B. licheniformis</i> UCP-1014.....	60

Figura 10 Estabilidade do retentado de proteases após incubação em diferentes pHs durante 30, 60 e 90 min	61
Figura 11 Estabilidade do retentado de proteases após incubação em diferentes temperaturas durante 30, 60 e 90 min	62
Figura 12 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios, em resposta à estabilidade da atividade proteolítica dos formulados com 20 dias de armazenamento a 28 °C, preparados a partir do retentado obtido por ultrafiltração e produzido por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 em cultivo submerso	65

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 Enzimas e microrganismos produtores20

Tabela 2 Inúmeras aplicações das proteases de origem microbiana na indústria23

CAPÍTULO 2

Tabela 1 Fatores e níveis do planejamento fatorial completo 2^4 55

Tabela 2 Matriz decodificada e resultados de atividade proteolítica do planejamento fatorial completo 2^4 56

Tabela 3 Produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melão 1% e uréia 0,5% em função do pH inicial do meio de cultivo.....58

Tabela 4 Atividades proteolíticas do retentado na presença de substâncias estabilizadoras determinadas com 10, 20 e 30 dias de armazenagem a 28 °C64

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

CAPÍTULO 1	14
1.1 Introdução	14
1.2 Objetivos	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos Específicos	16
1.3 Revisão de Literatura	17
1.3.1 Processos biotecnológicos	17
1.3.2 <i>Bacillus licheniformis</i>	18
1.3.3 Enzimas	19
1.3.3.1 Proteases	21
1.3.4 Biossurfactantes	25
1.3.5 Cultivo Submerso	28
1.3.6 Ultrafiltração	30
1.3.7 Estabilização de líquido metabólico com atividade proteolítica para aplicação industrial	32
1.4 Referências	33
CAPÍTULO 2	40
Produção de proteases e biossurfactantes por <i>Bacillus licheniformis</i> UCP-1014 em cultivo submerso	40
2.1 Resumo	41
2.2 Abstract	42
2.3 Introdução	43
2.4 Material e métodos	45
2.4.1 Microrganismo	45
2.4.2 Preparação e crescimento do inóculo	45

2.4.3 Meio de cultivo	45
2.4.4 Determinação de atividade proteolítica	46
2.4.5 Determinação de tensão superficial	46
2.4.6 Ultrafiltração	47
2.4.7 Efeitos de pH e temperatura na estabilidade de proteases.....	47
2.4.8 Formulação do líquido metabólico	48
2.5 Resultados e discussão	48
2.5.1 Investigação de fontes de carbono para produção de proteases.....	48
2.5.2 Seleção de fonte de nitrogênio	50
2.5.3 Planejamento fatorial 2^4 para investigação dos componentes do meio de produção de proteases	55
2.5.4 Influência do pH do meio de cultivo na presença de melaço e uréia	58
2.5.5 Ultrafiltração do líquido metabólico produzido por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 na presença de melaço e uréia	59
2.5.6 Estabilidade do retentado de proteases produzidas por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 após incubação em diferentes pHs	60
2.5.7 Estabilidade do retentado de proteases produzidas por <i>B. licheniformis</i> UCP-1014 em função de incubação sob temperaturas diferentes.....	62
2.5.8 Planejamento fatorial 2^3 na formulação do retentado do líquido metabólico contendo atividade proteolítica	63
2.6 Conclusões	66
2.7 Referências.....	67
CAPÍTULO 3	73
3.1 Conclusões gerais	73
3.2 Sugestões.....	73

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia representa o conjunto de técnicas que abrangem conhecimentos científicos biológicos e tecnológicos, aplicáveis aos processos interativos de organismos complexos e seus derivados. Combina protocolos de pesquisa já existentes com novos procedimentos científicos derivados de diferentes disciplinas como bioquímica, biologia molecular e celular, engenharia química, ciências da computação, ciências materiais, genética, imunologia, fisiologia, microbiologia, dentre outras (KREUZER; MASSEY, 2002; COSTA, 2006). Permite cultivar microrganismos para produzir e desenvolver produtos para setores como a agricultura, alimentação, energia, eletrônica, meio ambiente, pecuária, química e medicina (SILVEIRA, FUTINO, OLALDE, 2002).

As enzimas representam um dos principais grupos de produtos biotecnológicos. São proteínas com atividades catalíticas específicas, responsáveis pela vida celular e ao mesmo tempo, viabilizam processos fermentativos, cultura de células e técnicas biotecnológicas de fusão celular e DNA recombinante (SAID, PIETRO, 2004; VENTURA et al., 2008; PAIVA, PEREIRA, 2008).

O mercado mundial de enzimas crescerá em torno de 6,3% ao ano até 2013 e atingirá cifras em torno de US\$ 6 bilhões até 2011. Esse crescimento é impulsionado por uma sólida e contínua demanda de enzimas especiais, um bom crescimento no setor de alimentação animal, grande produção nas indústrias químicas, farmacêuticas, biocombustíveis e detergentes (FREDONIA, 2009). Europa Ocidental, América do Norte e Japão lideram o mercado de produção de enzimas, enquanto os países em desenvolvimento como China, Brasil e Índia apresentam crescimento rápido e constante no mercado de aplicação desses biocatalisadores (FREDONIA, 2009).

Além das enzimas, os surfactantes são compostos químicos também produzidos por via microbiana, que apresentam valor econômico e de ampla aplicação em diversos setores industriais. A grande maioria deles, disponível comercialmente, é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, os rápidos avanços na biotecnologia e o crescimento dos problemas ambientais, associados às novas legislações de controle do meio ambiente (BANAT et al., 2000) impulsionaram a procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Assim, o interesse por biossurfactantes produzidos por micro-organismos tem crescido nos últimos anos devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade, aceitabilidade ambiental e possibilidade de produção na presença de substratos renováveis (MAKKAR, CAMEOTRA, 2002; RUFINO, LUNA, SARUBBO, 2003). Outra importante propriedade dos biossurfactantes é a sua capacidade de apresentar atividade biológica como antifúngicos e antibióticos (MUKHERJEE et al., 2006).

O desenvolvimento da biotecnologia é vital para o futuro do Brasil, pois resulta em processos de baixo impacto ambiental desde que utilize os recursos naturais de maneira sustentável com preservação dos ecossistemas. O Brasil tenderá a ser a futura potência mundial por possuir a maior biodiversidade do planeta, desde que seja capaz de gerir esse imenso patrimônio, implementando políticas de incentivo às pesquisas para o desenvolvimento de tecnologias que potencializem a utilização dos recursos naturais e a produção de bens de elevado valor agregado (BON et al., 2008).

Considerando a existência de grande quantidade de resíduos industriais gerados no Brasil e a facilidade em cultivar microrganismos, foi investigado neste trabalho o potencial de produção de proteases e biossurfactantes por cultivo submerso de *B. licheniformis*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

- Investigar a produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis* UCP-1014 em meios nutritivos contendo resíduos agroindustriais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar *B. licheniformis* UCP-1014 em diferentes condições nutritivas e físico-químicas por cultivo submerso;
- Selecionar as melhores fontes de carbono e de nitrogênio para produção de proteases e biossurfactantes;
- Determinar a atividade proteolítica da enzima produzida no líquido metabólico;
- Determinar a tensão superficial do biossurfactante produzido;
- Avaliar os efeitos de pH e temperatura na estabilidade da atividade da protease e na redução da tensão superficial do biossurfactante;
- Concentrar o extrato bruto enzimático por ultrafiltração;
- Investigar a estabilidade do líquido metabólico concentrado em diferentes pHs e temperaturas;
- Estabilizar o líquido metabólico concentrado para aplicação industrial por planejamento fatorial;
- Investigar a estabilidade do líquido metabólico formulado durante o armazenamento;
- Analisar estatisticamente os resultados obtidos.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Processos biotecnológicos

Um processo biotecnológico envolve diversas etapas que dependem da escolha da matéria-prima, da esterilização dos meios de produção e dos equipamentos. O isolamento e a seleção de microrganismo, além do melhoramento genético das cepas e a conservação das culturas puras é determinante na produtividade do processo. O cultivo em biorreator, o controle do processo, a extração, a purificação e a formulação do produto, além do tratamento e reaproveitamento dos efluentes gerados, são etapas que influenciam diretamente o custo do produto final nos processos industriais (LIMA et al., 2001).

Os microrganismos são fontes produtoras de enzimas, biossurfactantes e de vários outros produtos microbianos de interesse, obtidos pelo aproveitamento de resíduos agroindustriais de baixo custo oriundos de fontes renováveis (FOX, BALA, 2000; MANEERAT, 2005; NITSCHKE et al., 2005; MUKHERJEE et al., 2006; NITSCHKE, PASTORE, 2006).

Uma grande variedade de microrganismos produz biossurfactantes e esse potencial tem despertado grande interesse dos pesquisadores no reaproveitamento dos resíduos industriais como alternativa para utilização como substratos de baixo custo, para produção de enzimas e biossurfactantes. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos representa uma alternativa econômica viável, para o desenvolvimento de formulações de biodetergentes (RAMMANI, KUMAR, GUPTA, 2005).

A aplicação de microrganismos na produção de biocatalisadores tem sido investigada em todo mundo. A biocatálise abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para converter um substrato com um número limitado de etapas enzimáticas. Para se estabelecer um processo de biotransformação eficaz, é necessária a análise detalhada da eficiência de três fatores: biocatalisador, bioconversão, isolamento e purificação do produto. Estes fatores condicionam o desenvolvimento e a otimização integrados de um processo biotecnológico (VENTURA, FREITAS, FREIRE, 2008; BON et al., 2008).

1.3.2 *Bacillus licheniformis*

Os microrganismos são utilizados desde a antiguidade na fermentação do suco de uvas e cereais para fabricar bebidas alcoólicas como o vinho e a cerveja, para alterar o leite e produzir os queijos, no tratamento dos couros, na produção de fármacos e muitos outros produtos. Podem ser encontrados em outros seres vivos, na água, no solo e no ar. Os ambientes mais propícios ao desenvolvimento e proliferação desses seres são aqueles que oferecem condições favoráveis como, disponibilidade de matéria orgânica e inorgânica, umidade e temperatura adequadas (VERMELHO et al., 2008).

Um microrganismo produz compostos de interesse industrial pelo consumo de substratos, paralelamente ao processo de crescimento e reprodução de material celular. Dentre os microrganismos de aplicação biotecnológica, ressaltam-se as bactérias, as leveduras e os fungos filamentosos que são organismos versáteis por utilizarem diversos tipos de substratos. Resíduos industriais têm sido metabolizados por microrganismos para produção de substâncias de elevado valor comercial (LIMA et al., 2001).

Dentre os microrganismos investigados, o gênero *Bacillus* compreende organismos que apresentam elevada taxa de crescimento e de grande capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular, apresentando estado de GRAS (Generally Recognized As Safe), exigência da FDA (Food and Drug Administration) para aplicação na área de alimentos (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004).

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam um elevado potencial biotecnológico em relação à produção de enzimas como as proteases, entre outras, que são utilizadas em escala industrial (SHAFFER et al., 2002; GORLACH-LIRA et al., 2010). Esse grupo de bactérias tem uma ampla versatilidade metabólica, faz parte da diversidade bacteriana de diversos ambientes naturais e antropogênicos (solo, ar, água, poeira de ossos em decomposição), estando também presentes na biota intestinal, e apresentam como característica marcante a capacidade de formar endósporos (CHANTAWANNAKUL, et al., 2002; LEE, TIN, KELLEY, 2007).

O gênero *Bacillus* apresenta um número de espécies importantes industrialmente na produção de proteases, como *B. subtilis*, *B. amyloliquefacies*, *B.*

thermoproteolyticus e *B. licheniformis*. Aproximadamente metade da atual produção de proteases deriva de isolados de *Bacillus sp.* Linhagens de *B. subtilis* representam a maior fonte de protease alcalina comercial do mundo (BEG, GUPTA, 2003).

As espécies *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* apresentam características GRAS e, por conseguinte, representam um enorme atrativo industrial (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004). O *Bacillus licheniformis* é uma bactéria Gram-positiva, em forma de bastonete, encontrada principalmente no solo e em penas de aves, é apatogênica aos homens e as plantas, apresenta motilidade, e é capaz de produzir esporos que apresentam resistência às condições ambientais adversas, seus esporos podem ser armazenados por longos períodos, o que torna viável a sua utilização para fins industriais como: produção de enzimas, antibióticos, pequenos metabólitos e formulação de produtos comerciais (VEITH et al., 2004). Pertence ao grupo de bactérias melhor adaptadas à vida no solo e na água, cujas espécies têm sido isoladas de ambientes mesofílicos e termofílicos (SOUZA, SILVA-SOUZA, 2001).

Segundo Schallmey, Singh e Ward (2004), *Bacillus licheniformis* vem sendo amplamente empregado na obtenção de proteases, as quais são utilizadas industrialmente na produção de detergentes. Devido à atividade hemolítica, esses microrganismos são produtores de biossurfactantes em potencial (YOUSSEF et al., 2004).

1.3.3 Enzimas

As enzimas são proteínas presentes e atuantes no metabolismo de todos os seres vivos, com capacidade de catalisar e acelerar reações químicas. São biocatalisadores de natureza protéica, produzidos por animais, vegetais e microrganismos (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

Amilase pancreática, lipase pancreática, pepsina, quimosina e pancreatina, são as enzimas de origem animal mais importantes. As de origem vegetal mais aplicadas são: α -amilase e β -amilase (malte), bromelina (abacaxi), ficina (figo) e papaína (mamão). No entanto, as enzimas de origem microbiana

podem substituir quaisquer enzimas de origem animal e vegetal e representam a maior parte das enzimas comercializadas atualmente (BON et al., 2008).

Alguns exemplos de enzimas e microrganismos produtores podem ser visualizados na tabela 1. A maior parte dos microrganismos produtores de enzimas são fungos filamentosos, sendo também ilustrados exemplos de leveduras e de bactérias produtores das enzimas: amilases, glicose oxidase, lactase, lipases e proteases.

Tabela 1 Enzimas e microrganismos produtores

Enzima	Atuação	Microrganismos produtores
Amilases	hidrolisam o amido	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus awamori</i>
Glicose oxidase	oxida a glicose em ácido glicônico	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Penicillium amagasakiense</i> , <i>Penicillium notatum</i>
Lactase	hidrolisa a lactose do leite	<i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Zygosaccharomyces lactis</i>
Lipases	hidrolisam triglicérides	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhysopus</i> sp.
Proteases	hidrolisam proteínas	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Aspergillus oryzae</i> <i>Endothia parasítica</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Aspergillus flavus</i>

Fonte: TOMOTANI et al., 2005

Em relação às enzimas obtidas a partir de animais, plantas e aos catalisadores químicos, as de origem microbianas apresentam inúmeras vantagens, principalmente por serem produzidas em grandes quantidades por processos biotecnológicos que atingem elevadas produtividades, considerando que os microrganismos possuem menor tempo de produção (LIMA et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007).

Esses biocatalisadores são aplicados nas indústrias de alimentos e bebidas (COURI et al., 2008), farmacêutica, têxtil (ANDREAUS, PAULO-CAVACO,

2008), de papel e celulose, químico-farmacêutica, em métodos analíticos químicos e de diagnóstico (SAID, PIETRO, 2004; SCHMIDELL, 2001).

Segundo Bon et al. (2008), o Brasil possui uma enorme variedade de matérias-primas renováveis passíveis de transformações por via enzimática, em produtos úteis e de maior valor agregado. A utilização desses recursos associados à aplicação das tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, responde às demandas de caráter tecnológico, de mercado e de preservação ambiental. Estudos realizados em 2005 mostraram a balança comercial brasileira com saldo negativo de 72% em relação ao mercado internacional de produção de enzimas. O Brasil participa apenas com 3,7% do total de enzimas comercializadas no planeta, importando 86% desse total e exportando apenas 14% dessa fração (BON et al., 2008).

1.3.3.1 Proteases

As proteases são enzimas de alta especificidade catalítica que atuam principalmente na hidrólise de proteínas (figura 1). Essas enzimas pertencem a um grupo grande e complexo e diferem entre si por suas especificidades pelo substrato, sítio ativo, mecanismo catalítico, perfis de estabilidade e atividade quanto à temperatura e ao pH (BEYNON; BOND, 2001).

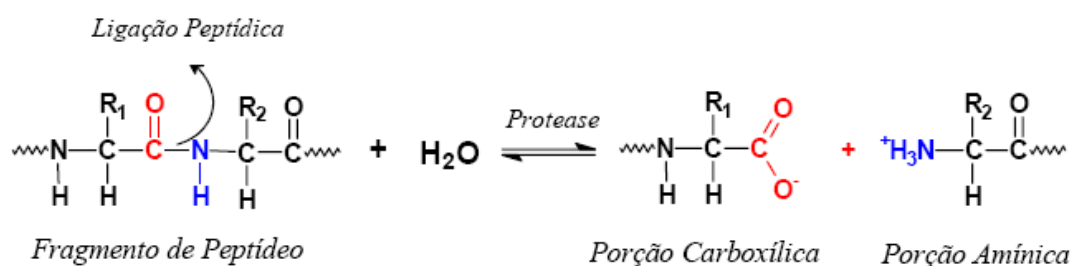


Figura 1 Representação esquemática da hidrólise de uma ligação peptídica catalisada por uma protease

Fonte: TARDIOLI, 2003

Enzimas proteolíticas foram as primeiras com aplicação tecnológica, pois já na antiguidade as proteases foram utilizadas na preparação de queijos e no tratamento de couros. Proteases microbianas constituem um dos mais importantes

grupos de enzimas de aplicação industrial; são responsáveis por cerca de 60% do mercado mundial de enzimas industriais (VERMELHO et al., 2008).

As proteases bacterianas apresentam aplicações em diversos processos biotecnológicos (NASCIMENTO, MARTINS, 2004). Devido a excelente atividade catalítica das proteases produzidas por *Bacillus* sp., essas enzimas são amplamente utilizadas nas indústrias (JOO, CHANG, 2005).

De acordo com o sistema internacional de nomenclatura, as enzimas proteolíticas pertencem à subclasse 4 da classe 3, classificadas pela *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry* como EC 3.4 Peptídeo hidrolase. As proteases são subdivididas em sub-subclasses com base nos seus mecanismos catalíticos e distinguidas com base em sua especificidade pelo substrato (BEYNON; BOND, 2001).

As enzimas proteolíticas são classificadas em endopeptidases e exoproteases. As endopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas das moléculas de proteína até um determinado nível, dando origem a peptídeos de cadeia longa. Já as exopeptidases removem sistematicamente aminoácidos da porção N terminal e C terminal das ligações peptídicas terminais, através da hidrólise, produzindo peptídeos de diferentes tamanhos e aminoácidos livres (CLEMENTE, 2000).

Segundo Hinsberger e Sandhu (2004), as proteases pancreáticas são divididas em metalo-proteases e serino-proteases (tripsina e quimiotripsina). A tripsina catalisa apenas a hidrólise das ligações peptídicas em que o grupo carbonila (-CO) é fornecido pela arginina ou lisina e a quimiotripsina hidrolisa ligações peptídicas em que o referido grupo é fornecido pela Fenilalanina, Tirosina e Triptofano e metalo-proteases (carboxipeptidases A e B).

A carboxipeptidase A (EC 3.4.17.1) é uma exopeptidase produzida no pâncreas de animais superiores como um composto de três cadeias polipeptídicas, que, por ativação com tripsina, produz a enzima com uma única cadeia polipeptídica, contendo 307 resíduos de aminoácidos. O pâncreas produz também outro zimogênio que, por ativação, produz a carboxipeptidase B. As duas enzimas são similares nos detalhes gerais do mecanismo catalítico, ou seja, ambas requerem que o grupo carboxílico do resíduo carboxi-terminal esteja livre e ambas possuem Zn^{2+} no sítio ativo, essencial para a atividade catalítica (VIEIRA, 2007).

As proteases alcalinas são um dos grupos de enzimas amplamente estudados devido à elevada atividade catalítica além das muitas aplicações industriais (tabela 2), como, em alimentos, couro, indústrias farmacêuticas e de detergente (DAYANANDAN et al., 2003; JOO, CHANG, 2005). Além disso, elas também são utilizadas para a limpeza das membranas de ultrafiltração de proteínas. Dessas diferentes aplicações, a principal utilização de proteases alcalinas consiste principalmente em detergentes industriais (GUPTA et al., 2002). Essas enzimas estão presentes na formulação de todos os tipos de detergentes de roupas, incluindo os detergentes de lavagem automática com função de degradar manchas protéicas (MAURER, 2004).

Tabela 2 Inúmeras aplicações das proteases de origem microbiana na indústria

Fonte de obtenção	Enzima	Aplicação industrial
Animal	Tripsina, Quimotripsina, etc	Indústria farmacêutica, de couro, processamento de alimentos, especialmente hidrólise de proteínas, e síntese de peptídeos
Vegetal	Papaína, Ficina, Bromelina	Produção de extratos de leveduras, cerveja resistente ao congelamento, panificação, fármacos, amaciamento e carne.
Microrganismos		
<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijos, carnes, pescados, cereais, bebidas. Indústria cervejeira e de panificação. Manufatura de queijo
(<i>Aspergillus melleus</i> , <i>Endothia parasitica</i> , <i>Mucor mehei</i> e <i>Mucor pusillus</i>) (<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>)	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústrias de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos.
(<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>)	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação.

Fonte: WISEMAN, 1981

Uma grande proporção de proteases comercialmente disponível é derivada de cultivo de *Bacillus* (THANGAM, RAJKUMAR, 2000; GUPTA, BEG, LARENZ, 2002). No entanto, a enzima bacteriana serina protease alcalina (EC 3.4.21.62) é o mais importante membro da família das proteases alcalinas para aplicação industrial. Essa endopeptidase é capaz de hidrolisar o interior de ligações peptídicas das moléculas de proteína. É uma enzima produzida principalmente pelo gênero *Bacillus* como, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. horikoshii* e *B. sphaericus* (SOUZA et al., 2008).

Proteases microbianas podem ser produzidas a partir de bactérias, fungos filamentosos e leveduras, utilizando processos de fermentação em estado sólido e submersa. No entanto, mesmo com alguns relatos publicados sobre a produção de protease alcalina por fermentação em estado sólido (KAUR et al., 2001; AIJUN, HONGZHANG, ZUOHU, 2005), o principal processo industrial para a produção dessa enzima é realizada em grande escala por cultura submersa (KAUR et al., 2001).

Para a produção industrial de proteases alcalinas, são usualmente empregados meios de crescimento que contém uma elevada concentração de carboidratos, proteínas e outros componentes dos meios de produção. Com o objetivo de desenvolver tecnologias economicamente viáveis, investigações estão sendo feitas visando a um melhor rendimento das proteases alcalinas e à otimização do meio de fermentação e das condições de produção em escala industrial. No entanto, sabe-se que 40% do custo de produção de enzimas industriais em larga escala é creditado ao meio de crescimento. Relativamente a esse fato, a utilização dos meios de cultivo de baixo custo efetivos para o crescimento e produção de protease alcalina, como resíduos agroindustriais é especialmente importante e tem se tornado uma opção economicamente viável (DAYANANDAN et al., 2003).

Pela versatilidade de aplicação em diversos setores industriais e grande potencial e valor econômico que apresenta, estudos são realizados na busca de condições ótimas de cultivo para a produção de proteases por microrganismos. Adinarayana, Jyothi e Ellaiah (2005), produziram protease alcalina por células de *Bacillus subtilis* PE-11, imobilizadas em diferentes suportes; e utilizou como nutrientes: glicose 2 g/L, caseína 0,5 g/L, peptona 0,5 g/L, extrato de levedura 0,5 g/L e 50 mL de solução salina (KH₂PO₄ 5,0 g/L, MgSO₄.7H₂O 5 g/L e FeSO₄.7H₂O

0,1 g/L). O pH do meio foi mantido em 7,0 e incubado a 37 °C sob agitação de 220 rpm. O processo ocorreu em bateladas repetidas com as células do bacilo imobilizadas em cada um dos suportes investigados; tendo o alginato de cálcio apresentado a melhor produtividade média específica por volume, 15,11 U/mL.h e pH 8,2 com atividade estável por 9 dias. As enzimas imobilizadas apresentam grande vantagem, em relação às solúveis, devido a sua maior estabilidade e facilidade de separação do meio de reação, com geração de uma economia no custo do processo (CASTRO et al., 2008).

Segundo Santos e Sato (2009), o crescimento celular e a produção de proteases pelo microrganismo *Cellulans cellulosimicrobium*, utilizando células secas de *Saccharomyces cerevisiae* como fontes de carbono e de nitrogênio para o crescimento celular, na presença de caseína indicou que o meio de cultura ideal para a produção máxima de proteases apresentava a seguinte composição: 0,2 g/L de MgSO₄.7H₂O, 2,0 g/L de (NH₄)₂ SO₄ e 8% de células de levedura desidratadas em tampão fosfato 0,15 M e pH 8,0, sob agitação de 150 rpm e aeração durante 24 h. A produção máxima de proteases alcalinas foi 7,0 ± 0,27 U/mL; a protease bruta apresentou estabilidade e atividade ótima a 50 °C e pH entre 7,0 e 8,0.

Potumarthi e Jetty (2007) avaliaram o efeito da aeração e da agitação na produção de proteases alcalinas por *B. licheniformis* NCIM-2042 com fermentação submersa em meio nutriente com a seguinte composição: peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L, extrato de leveduras 2 g/L, NaCl 5 g/L; o pH foi ajustado em 7,2. A maior produção de proteases foi obtida após 72 h de cultivo, a qual diminuiu nas horas seguintes. O melhor resultado para a combinação agitação e fluxo de ar foi 3 vvm de taxa de fluxo de ar a 200 rpm. A produção máxima de proteases foi 102 U/mg em pH 9,5. Foi constatado também que o aumento na concentração da caseína incidiu num aumento da viscosidade do caldo e do tempo de fermentação, o que reduziu a taxa de transferência de oxigênio.

1.3.4 Biossurfactantes

Surfactantes ou tensoativos são compostos orgânicos, constituídos por moléculas anfifílicas (figura 2), contendo porções polares (cabeça) e apolares

(cauda), com propriedades de atividade superficial, resultado da adsorção destes compostos na superfície de líquidos ou na interface entre dois líquidos imiscíveis (ZANA, 2005; LUNA et al., 2008).

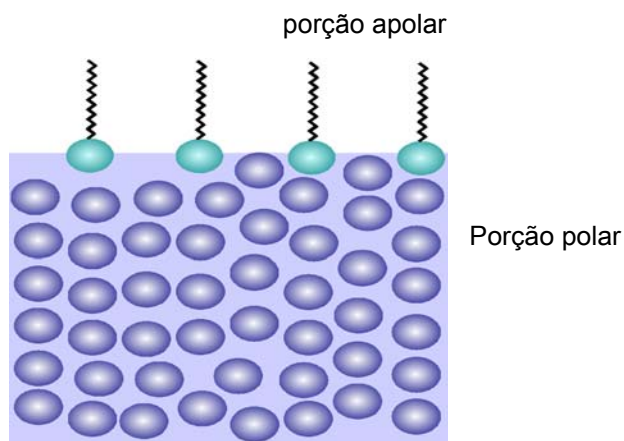


Figura 2 Representação da alocação dos surfactantes na superfície de um líquido polar
Fonte: ZANA, 2005

Os surfactantes formam micelas e outros agregados em meio aquoso, acima de uma determinada concentração, nas quais a porção lipofílica das moléculas ou íons fica orientada para o interior da micela e apenas os grupos polares ficam na parte externa, em contato com a água. Forças eletrostáticas (figura 3) concentram os compostos hidrofílicos juntos à superfície de micelas e os compostos lipofílicos podem ser solubilizados em seu interior (MULLIGAN, 2005).



Figura 3 Representação das forças eletrostáticas
Fonte: MULLIGAN, 2005

De acordo com Mulligan (2005), biossurfactantes são conhecidos por conferir excelente detergência e emulsificação, capacidade espumante e

dispersante. São compostos com atividade tensoativa, produzidos por várias espécies de microrganismos. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de moléculas quimicamente distintas como: glicolipídios, lipossacarídios, fosfolipídios, ácidos graxos, lipopeptídios, lipídios neutros e alguns polímeros (LANG, 2002; MAIER, 2003).

Segundo Maneerat (2005), uma grande variedade de microrganismos produz biossurfactantes e essa perspectiva tem despertado grande interesse dos pesquisadores no reaproveitamento dos resíduos industriais como alternativa para o fornecimento de substratos de baixo custo para a produção de biossurfactantes.

Sepahy et al. (2005) estudaram a produção de biossurfactantes por isolados de bacilo em condições mesofílicas e termofílicas em campos de petróleo. Algumas das fontes de carbono utilizadas foram: sacarose, glicose, frutose e manose, no entanto a glicose apresentou os melhores resultados. As trinta e cinco cepas gram positivas isoladas produziram biossurfactante que apresentaram tensão superficial de 30 mN/m quando as amostras foram incubadas por 15 min a 40 °C. O efeito da temperatura sobre isolados de três estirpes foi investigado numa faixa de 30 a 80 °C e verificou-se que para temperaturas acima de 50 °C houve uma redução drástica na produção de surfactante. O estudo sobre a produção de biossurfactante em meio contendo NaCl, indicou a capacidade dessas cepas em produzir biossurfactante na presença de NaCl 3 – 5% com pH na faixa de 6,5 a 8,5.

Barros, Quadros e Pastore (2008), estudaram a estabilidade do biossurfactante produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis*, cultivado em manipueira, em um processo piloto. O biossurfactante produzido apresentou excelente capacidade tensoativa, reduzindo a tensão da água de 72,31 para 27,01 mN/m. Estudos da estabilidade foram realizados em função da variação de temperatura, pH e concentração salina. Foram realizadas avaliações da sua capacidade emulsificante em meio polar e apolar, bem como a estabilidade das emulsões formadas. O biossurfactante obtido se mostrou estável à temperatura de 100 °C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, frente a concentrações de NaCl entre 2,5 e 20%, e variação de pH na faixa de 6 a 10. Durante a investigação, Barros, Quadros e Pastore (2008), determinaram ótimos resultados para o índice de emulsificação com 24 h de cultivo do *B. subtilis* frente a diversos hidrocarbonetos e óleos vegetais. De acordo com os autores os resultados obtidos demonstraram a

importância do biossurfactante para potenciais aplicações em diversos ramos industriais.

1.3.5 Cultivo Submerso

Os processos submersos são aqueles em que a célula produtora se desenvolve no interior do meio de cultivo, geralmente agitado. A massa de células cultivadas fica totalmente submersa de maneira uniforme no meio nutriente, que pode ser ajustado para fornecer as condições ideais de crescimento e produção. No caso de fermentações aeróbicas, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, através de um compressor, por borbulhamento de ar no líquido. Comparados com os processos em superfície (meio sólido), os processos submersos oferecem uma série de vantagens, como manipular, com maior facilidade, maiores volumes de meio, facilidade operacional (SILVEIRA, 2003).

A absorção de nutrientes e excreção de metabólitos é realizada com maior eficiência, reduzindo o tempo de processo e aumentando a produtividade. Atualmente, a maioria das fermentações industriais importantes é realizada por processo submerso. A redução no preço de muitos produtos, anteriormente obtida por processos de cultivo em superfície, se tornou possível devido à possibilidade de adaptá-los aos processos submersos. Na década de 40, a produção de penicilina teve seu processo de produção modificado. Logo, o desenvolvimento da tecnologia de fermentação submersa para a produção de antibióticos foi implementada pela indústria de enzimas, sendo hoje o processo de produção mais utilizado (SILVEIRA, 2003).

A cinética enzimática é muito utilizada no estudo dos processos microbianos na área da biotecnologia. Quando colocados em um meio de crescimento com os nutrientes necessários ao seu metabolismo, os microrganismos se adaptam a esse meio, ocorrendo o crescimento e a reprodução com produção de metabólitos. No entanto, a presença de substâncias inibidoras formadas pelo próprio microrganismo ou presentes no meio de crescimento, pode interferir no crescimento microbiano, resultando também na inibição da produção de metabólitos (SCHMIDELL, 2001).

No estudo da cinética microbiana é necessário o conhecimento de parâmetros que interferem no crescimento e reprodução do microrganismo além da formação do produto final de aplicação tecnológica. Nos processos fermentativos, são investigados: o crescimento da biomassa (X), os produtos formados (metabólitos) (P) e os substratos que compõem o meio de cultura (S) em função do tempo (t). A cinética microbiana permite comparar diferentes formas de cultivo e estabelecer a melhor condição em função dos nutrientes, pH, temperatura, velocidade de agitação, taxa de aeração, cultivo dentre outros parâmetros desse cultivo (SCHMIDELL, 2001).

As quatro fases do crescimento populacional microbiano em um ambiente fechado na presença de um meio de cultura e sob condições aeróbias estão ilustradas na figura 4.

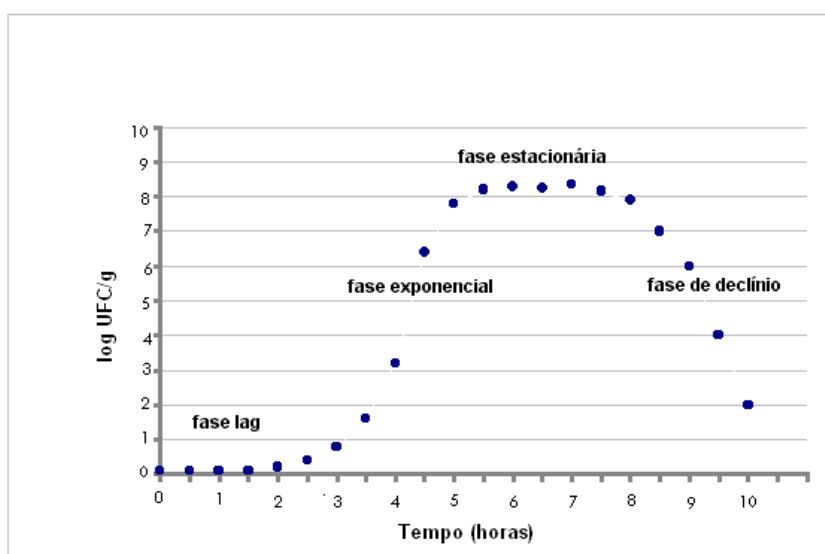


Figura 4 Padrão de crescimento típico de uma cultura bacteriana em um sistema fechado

Fonte: Crescimento, 2011

A fase lag ou de latência é a que segue imediatamente após a inoculação do meio com o microrganismo; é o período de adaptação do microrganismo ao novo ambiente durante o qual, a célula sintetiza as enzimas requeridas para o crescimento nas novas condições ambientais. O número de indivíduos não aumenta, podendo até mesmo decrescer. A duração da fase lag será tão mais longa quanto maiores as diferenças de composição do ambiente anterior ou se a população for constituída de bactérias esporuladas (EMBRAPA, 2011).

A fase exponencial é caracterizada pela duplicação do número de células da população a cada geração. No entanto essa taxa de crescimento não pode ser mantida indefinidamente em um sistema fechado. Após um determinado período de crescimento exponencial, as condições ambientais tornam-se desfavoráveis, pela escassez de nutrientes essenciais, o acúmulo de metabólitos tóxicos e ou limitação de espaço. À medida que a disponibilidade de nutrientes diminui as células se tornam menos capazes de gerar ATP e a taxa de crescimento se reduz. A duração da fase exponencial é altamente variável dependendo tanto das características genéticas do microrganismo quanto das condições ambientais (LIMA et al., 2001).

Na fase estacionária a taxa de crescimento diminui significativamente devido às condições limitantes do meio. As células continuam metabolizando e se dividindo, mas parte das células torna-se inviável e a taxa de divisão celular é muito próxima da taxa de morte celular, o que mantém constante o número de células viáveis na população. Frequentemente, as células mortas sofrem autólise e os carboidratos, aminoácidos e outros componentes liberados da célula rompida são então usados como nutrientes pelas células remanescentes da população (EMBRAPA, 2011).

A duração da fase estacionária depende do balanço entre a taxa de divisão celular e o número de células que vão se tornando inviáveis devido às condições ambientais tornarem-se progressivamente desfavoráveis.

Na fase de declínio, as células perdem a capacidade de se dividir, a taxa de morte celular torna-se maior que a taxa de divisão e o número de células viáveis decresce exponencialmente até a completa extinção da população. Nessa fase muitas células assumem formas incomuns. Em bactérias formadoras de esporos sobrevivem mais esporos que células vegetativas. A duração dessa fase depende tanto das características genéticas da bactéria quanto das condições ambientais (EMBRAPA, 2011).

1.3.6 Ultrafiltração

A ultrafiltração é um método de concentração bastante utilizado com a finalidade de recuperar, além de concentrar gorduras, emulsões, colóides e

proteínas, que são utilizadas como aditivos em diversos produtos industriais. O concentrado de enzimas favorece o seu transporte e acondicionamento, o que viabiliza a sua utilização por diminuir os custos com frete e facilitar o manuseio (PEPPIN, ELLIOT, 2001; FRANCO, 2006).

Na ultrafiltração, o fluxo de entrada é separado em dois fluxos de saída, conhecidas como permeado e retentado. O permeado é a fração que atravessa a membrana semi-permeável e o retentado é a fração enriquecida com os solutos ou sólidos suspensos que não atravessam a membrana.

A figura 4 ilustra a técnica de ultrafiltração visando concentrar proteínas contidas num meio líquido (FRANCO, 2006).

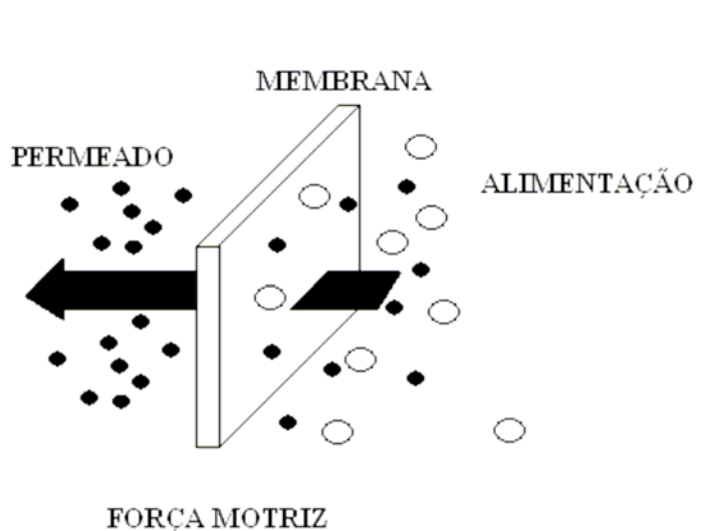


Figura 5 Representação de ultrafiltração por membrana filtrante
Fonte: FRANCO, 2006

A função da membrana é atuar como barreira seletiva, permitindo a passagem de certos componentes e retendo outros componentes na mistura. A seletividade da membrana está relacionada às dimensões da molécula ou partícula, ao tamanho do poro, à difusibilidade do soluto na matriz e às cargas elétricas associadas (FRANCO, 2006).

Os processos de separação com membrana como a microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa se diferenciam dos processos clássicos de filtração por utilizar meios filtrantes (membranas) com poros cada vez menores, os quais utilizam a diferença de pressão como força motriz (HABERT, BORGES, NÓBREGA, 2006).

A ultrafiltração é utilizada na concentração e fracionamento de proteínas, recuperação de pigmentos e recuperação de óleos. Durante o processo de ultrafiltração é aplicada uma força motriz de 1 a 7 atm. Por exemplo, quando o material retido for colóides e macromoléculas de massa molar maior que 5 kDa, o material permeado, são a água (solvente) e sais solúveis de baixa massa molar, menor do que a porosidade da membrana (FRANCO, 2006).

Brião (2007) avaliou o uso da ultrafiltração para a remoção de nutrientes em efluentes de indústrias de laticínio. Para tanto, utilizaram membranas tubulares e espiraladas que apresentaram diferentes tamanhos de poros, constituídas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) ou de polietersulfona. Os resultados indicaram eficiência de remoção de DQO (próximo a 75%), de proteínas (acima de 90%) e de gorduras (acima de 90%).

1.3.7 Estabilização de líquido metabólico com atividade proteolítica para aplicação industrial

A aplicação industrial de enzimas exige a estabilização do líquido metabólico para que a atividade seja máxima durante o armazenamento e utilização do produto final.

A formulação de produtos contendo enzimas é essencial na utilização e comercialização dos mesmos, visando à minimização da perda de atividade durante o armazenamento e aplicação do produto. Na formulação, são utilizadas substâncias conservantes e estabilizadoras de enzimas, considerando que esses biocatalisadores são moléculas protéicas complexas que devem manter sua estrutura para que sua atividade catalítica seja preservada e que tenham uma longa vida de prateleira (NASCIMENTO; MARTINS, 2006).

Na formulação de produtos contendo enzimas, são também utilizadas substâncias conservantes, visando eliminar possíveis contaminações microbiológicas durante o armazenamento do produto, considerando que as enzimas comerciais geralmente são produzidas a partir de um meio de cultivo contendo nutrientes e, por conseguinte, favorece a proliferação microbiana.

1.4 REFERÊNCIAS

ADINARAYANA, k.; JYOTHI, B.; ELLAIAH, P. Production of alkaline protease with immobilized cells of *Bacillus subtilis* PE-11 in various matrices by entrapment technique. **AAPS pharmSciTech**. Disponível em: <<http://www.aapspharmscitech.org>>, p. E391-E397, 2005. Acesso em: 10 jul. 2010.

AIJUN, Z.; HONGZHANG, C.; ZUOHU, L. Air pressure pulsation solid state production of alkaline protease by *Bacillus pumilus* 1.1625. **Process Biochemistry**, v.40, p.1547-1551, 2005.

ANDREAUS, J.; PAULO-CAVACO, A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 8, p. 179-204, 2008.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. **Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira**. Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.28, p. 979-985, out./dez. 2008.

BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of a oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 294 - 304, Feb.2003.

BEYNON, R.; BOND, J. S. **Proteolytic Enzymes: a practical approach** 2 ed. Oxford, IRL Press at Oxford University Press, 2001. 340p.

BON, E. P. S.; JR, N. P.; GOTTSCHALK, L. M. F.; PEREIRA-SÁ, PAULA; ROSEIRO, J. C.; FERRARA, M. A. Bioprocessos para produção de enzimas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 5, p. 95-122, 2008.

BON, E. P. S.; COSTA, R. B.; SILVA, M. V. A.; LEITÃO, V. S. F.; FREITAS, S. P.; FERRARA, M. A. Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 20, p.463-488, 2008.

BRIÃO, V. B. **Processos de separação por membranas para reuso de efluentes de laticínios**. 94 f. 2007. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Maringá, 2007.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; PEREIRA-SÁ, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: E. P. S. BON; M. A. FERRARA; M. L. CORVO; VERMELHO, A. B.; PAIVA, C. L. A.; ALENCASTRO, R. B.; COELHO, R. R., editores. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, cap. 6, p. 123-151, 2008.

CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; LUMYONG, S. Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **Science Asia**, Thailand, v. 28, p. 241-245, 2002.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Science Technol**, v. 11, n. 7, p. 254-262, 2000.

COSTA, E. T. **Cooperação internacional em biotecnologia**. 78 f. 2006. Monografia (Graduação em Relações Internacionais) - Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2006.

COURI, S.; PARK, Y.; PASTORE, G.; DOMINGOS, A. Enzimas na produção de alimentos e bebidas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, p. 153-177, 2008.

Crescimento populacional de bactérias. Disponível em: <[HTTP:// www.in.professor.ucg.br/.../Crescimento%20Populacional%20de%20Bactérias.pdf](http://www.in.professor.ucg.br/.../Crescimento%20Populacional%20de%20Bactérias.pdf)>. Acesso em: 21 fev. 2011.

DAYANANDAN, A. A.; KANAGARAJ, J. B.; SOUNDERRAJ, L. A. R.; GOVINDARAJU, R.; RAJKUMAR, G. S. Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. **J. Cleaner Production**, v.11. p. 533-536, 2003.

EMBRAPA. Biotecnologia aplicada à engenharia de alimentos. **Biotecnologia Aplicada à Agropecuária**. Disponível em: <[HTTP:// www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/.../capitulo12.pdf](http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/.../capitulo12.pdf)>, Acesso 21 fev. 2011.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases – características e aplicações industriais. In: S. Said, R. C. L. R. Pietro. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 327-348, 2004.

FOX, S.L.; BALA, G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRANCO, R. L. M. **Recuperação e concentração das proteínas do soro de leite das queijarias do município de nossa senhora de lourdes/sergipe visando o desenvolvimento sustentável da região**. 2006. 109 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2006.

FREEDONIA Group Inc. OH, USA. **World Enzymes business report**. setembro 2009. Disponível em: <<http://www.freedoniagroup.com/World-Enzymes.html>>. Acesso em: 30 jul. 2010.

GORLACH-LIRA, K.; PEDROZA, M. L. V.; BURDZIEJ-POKOJSKA, A.; ROZYCKI, H.; DAHM, H. Response surface analysis on the effect of temperature and pH on Growth and proteolytic activity of thermophilic *Bacillus* sp. **Braz. arch. biol. technol.** vol.53, n 5. Curitiba, Sept./Oct. 2010

GUPTA R; BEG QK; KHAN S; CHAHUAN B. An overview on fermentation, downstream processing an properties of microbial alkaline proteases. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 381-395, 2002.

GUPTA, R.; BEG, Q.K.; LARENZ, P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 15-32, 2002.

HARBERT, A.C.; BORGES, C.P.; NOBREGA, R. Aspectos gerais dos processos com membranas. In: HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos de separação por membranas. 1. ed. Rio de Janeiro, E-papers, 2006. 180p.

HINSBERGER, A.; SANDHU, B.K. Digestion and absorption. **Current Paediat.**, v.14, p. 605-611, 2004.

JOO, H.S.; CHANG, C.S. Production of an oxidant and SDS – stable alkaline protease from an alkaophilic *Bacillus clausii* I – 52 by submerged fermentation: feasibility as laundry detergent additive, **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 38, p. 176 – 183, 2005.

KAUR, S.; VOHRA, R.M.; KAPOOR, M.; BEG,Q.K.; HOONDAL, G.S. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v. 17, p. 125-129, 2001.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia Genética e Biotecnologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 17-45, 2002.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 7, n 1-2, p. 12-20, 2002.

LEE, L.; TIN, S.; KELLEY, S. T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. **BioMedical Central**, v. 7, n. 27, p. 1-13, 2007.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: vol.3, Edgard Blucher Ltda, 2001, 593p.

LUNA, J.M.; RUFINO, R. D.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Produção de biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta**, v. 6, p. 209-215, 2008.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNETT, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. *Advances Applied Microbiology*, v. 52. USA: **Academic Press**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Anupdate on the Use of Unconventional substrates for Biosurfactant Production and their New Applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Songklanakarín Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MAURER, K.H. Detergent proteases. **Current. Opinion Biotechnology**, v. 5, p. 330-334, 2004.

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.

MULLIGAM, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2005.

NASCIMENTO, W. C.; MARTINS, M. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, Rio de Janeiro, v. 35, p. 91-96, 2004.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus* spSMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 582-588, 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.; HADDAD, R.; GONÇALVES, L. A. G.; Eberlin, M. N.; CONTIERO, J. Oil Wastes as Unconventional Substrates for Rhamnolipid Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnol Prog**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

NITSCHKE, M. E.; PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; JUNIOR, C. Produção de Amilase por Rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato: **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 61-66, 2007.

PAIVA, C. L. A.; SÁ-PEREIRA, PAULA. A aplicação da biologia molecular na produção de enzimas. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, cap. 2, p. 29-53, 2008.

PEPPIN, S. S. L.; ELLIOT, J. A. W. Non-equilibrium thermodynamics of concentration polarization. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 92, p. 1-72, 2001.

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. **Biochemistry Engineering Journal**, v.34, p. 185 -192, 2007.

RAMNANI, P.; KUMAR, S. S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3352-3359, 2005.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A. Biosurfactant Production by *Candida lipolytica* Using Corn Oil as Substrate. **5 Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2003.

SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Leggis Summa, p. 93-96, 2004.

SANTOS, L. F.; SATO, H. H. **Production of alkaline protease from *Cellulosimicrobium cellulans***. Departamento de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p.54-60, 2009.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, P. O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia bioquímica. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, vol. 3, 2001, p. 593.

SEPAHY, A. A.; ASSADI, M. M.; SAGGADIAN, V.; NOOHI, A. Production of biosurfactant from iranian oil fields by isolated bacilli. **International Journal of Environmental Science and Technology** Vol. 1, p. 287-293, 2005.

SHAFFER, C.D., STEPHENS, G.E., THOMPSON, B.A., FUNCHES, L., BERNAT, J.A., CRAIG, C.A., ELGIN, S.C.R. Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, p. 14332-14337, 2002.

SILVEIRA, J. M. J.; FUTINO, A. M.; OLALDE, A. R. Biotecnologia: corporações, financiamento da inovação e novas formas organizacionais. **Revista Economia e Sociedade** nº 18. Campinas: IE/UNICAMP, 2002.

SILVEIRA, M. L. L. **Comparação entre o desempenho do inóculo sólido e inóculo líquido para cultivo de *pleurotus ostreatus* dsm 1833**. 2003. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2003.

SOUZA, J.A.; SILVA-SOUZA, A.T. Bacterial Community Associated with Fish and Water from Congonhas River, Sertaneja, Paraná, Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44: p. 373-381, 2001.

SOUZA, M.W.S.; BIASUTTI, E.A.R.; CARREIRA, R.L.; AFONSO, W.O.; SILVA, V.D.M.; SILVESTRE, M.P.C. Obtaining oligopeptides from whey: use of subtilisin and pancreatin. **American Journal of Food Technology**, v. 3, p. 315-324, 2008.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase a e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. 2003. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

THANGAM, E. B.; RAJKUMAR, G. S. Studies on production of extracellular protease by *Alkaligenes faecalis*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v.16, p. 663-666, 2000.

TOMOTANI, E.J.; NEVES, L.C.M.; VITOLO, M. Oxidation of glucose to gluconic acid by glucose oxidase in a membrane bioreactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121-124, p.149-162, 2005.

VEITH, B.; HERZBERG, C.; STECKEL, S.; FEESCHE, J.; MAURER, K. H.; EHRENREICH, P.; BAUMER, S.; HENNE, A.; LIESEGANG, H.; MERKL, R.; EHRENREICH, A.; GOTTSCHALK, G. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, V. 7, p. 204-211, 2004.

VENTURA, M.M.; FREITAS, S.M.; FREIRE, A.P. Cátalise Enzimática - Alguns Destaques na Evolução da Enzimologia. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, cap. 1, pag. 1-26, 2008.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, cap.11, p. 273-287, 2008.

VIEIRA, C. R. **Extração, hidrólise e Remoção de fenilalanina das proteínas de farinha de arroz.** 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

YOUSSEF, N. H.; DUNCAN, K. E.; NAGLE, D. P.; SAVAGE, K. N.; KNAPP, R. M.; McINERNEY, M. J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 339-347, 2004.

ZANA, R. Dynamics of surfactant self-assemblies: Micelles, microemulsions, vesicles and lyotropic phases. **Surfactant Science Series**. New York: CRC Press, v. 125, 2005, 539 P.

CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO DE PROTEASES E BIOSURFACTANTES POR *Bacillus licheniformis* EM CULTIVO SUBMERSO*

Marcelo de Andrade Silva
Daniela da Silva Gomes
Leonie Asfora Sarubbo
Alexandra Amorim Salgueiro

Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – NPCIAMB
Universidade Católica de Pernambuco
Rua do Príncipe, 526 , Boa Vista, 5050-990, Recife, PE, Brasil

*Manuscrito a ser submetido à Revista Brazilian Journal of Microbiology

2.1 RESUMO

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas aplicadas comercialmente e os biossurfactantes são biomoléculas aplicadas em diversas indústrias, ressaltando as de petróleo e seus derivados. O presente trabalho teve por objetivo investigar a produção de proteases e biossurfactantes por *Bacillus licheniformis* UCP-1014 na presença de nutrientes de baixo custo. Os experimentos foram realizados em frascos de Erlenmeyer, em triplicata, com 10% v/v de inóculo (contendo 10^6 UFC/mL), a 150 rpm e a 37 °C. Foram investigadas diferentes pHs, fontes de carbono e de nitrogênio. Um planejamento fatorial foi realizado para investigar as concentrações dos componentes do meio de cultivo. Amostras de líquido metabólico foram coletadas, centrifugadas e os sobrenadantes utilizados para determinar pH, atividade proteolítica e tensão superficial. O líquido metabólico livre de células foi concentrado vinte vezes por ultrafiltração e a estabilidade da atividade proteolítica no retentado foi determinada quanto ao pH e à temperatura. Para formulação do retentado, foi aplicado um planejamento fatorial 2^3 e a estabilidade proteolítica foi determinada com 10, 20 e 30 dias de armazenamento. A determinação de proteases foi realizada na presença de azo-caseína. A cultura de *B. licheniformis* UCP-1014 produziu 112 U/mL de proteases com 24 h de cultivo submerso na presença de melaço 1% e uréia 0,5%, a pH 7,5. A redução da tensão superficial do líquido metabólico não foi significativa nessas condições de trabalho. O concentrado de proteases produzidas por *B. licheniformis* apresentou estabilidade da atividade enzimática na ausência do substrato, em pH 7 durante 60 min de incubação e estabilidade térmica entre 40-90 °C durante 90 min. O líquido metabólico concentrado e formulado reteve cerca de 50% da atividade proteolítica cujo valor diminuiu durante o armazenamento a 28 °C. Proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 apresentaram estabilidades térmica e sob condições adversas de pH quando melaço e uréia foram utilizados na composição química do meio de produção por cultivo submerso.

Palavras-Chave: enzimas proteolíticas, biossurfactantes, *Bacillus licheniformis*, resíduos industriais, cultivo submerso.

2.2 ABSTRACT

Proteases constitute one of the most important groups of enzymes and biosurfactants applied commercially biomolecules are applied in various industries, highlighting the oil and its derivatives. This study aimed to investigate the production of protease and biosurfactant by *Bacillus licheniformis* UCP-1014 in the presence of nutrients at low cost. The experiments were performed in Erlenmeyer flasks, in triplicate, with 10% v/v inoculum (containing 10^6 CFU / mL) at 150 rpm and 37 ° C. Different pHs were investigated, sources of carbon and nitrogen. A factorial design was conducted to investigate the concentrations of the medium. Metabolic fluid samples were collected, centrifuged and the supernatant used to determine pH, proteolytic activity and surface tension. The cell-free metabolic liquid was concentrated twenty times by ultrafiltration and stability of proteolytic activity in the retentate was determined for pH and temperature. In making the retentate was used a factorial design, and protease stability was determined during storage. The determination of protease was performed in the presence of azo-casein. The culture of *B. licheniformis* UCP-1014 produced 112 U / ml protease at 24 h of submerged cultivation in the presence of 1% molasses and urea 0.5%, pH 7.5. The reduction in surface tension was not significant in these metabolic conditions. The concentration of proteases produced by *B. licheniformis* enzyme activity was stable in the absence of substrate at pH 7 during 60 min of incubation and thermal stability between 40 - 90 °C for 90 min. The liquid concentrate and formulated metabolic retained about 50% of proteolytic activity whose value decreased during storage at 28 °C. Proteases produced by *B. licheniformis* CPU-1014 thermal stabilities present and under adverse conditions of pH when molasses and urea are used in the chemical composition of the means of production by submerged cultivation.

Keywords: proteolytic enzymes, biosurfactant, *Bacillus licheniformis*, industrial waste, submerged, cultivation

2.3 INTRODUÇÃO

O Brasil gera uma enorme quantidade e variedade de matérias-primas residuais passíveis de transformações por via microbiana em produtos de maior valor agregado, respondendo às demandas tecnológicas, de mercado e de preservação ambiental. Na presença de diferentes resíduos, os microrganismos produzem enzimas e surfactantes, dentre outros produtos de valor econômico (COELHO, SALGADO, RIBEIRO, 2008).

A produção industrial de enzimas é limitada pelos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos microrganismos. Estima-se que aproximadamente 30 a 40% do custo envolvido na produção de proteases sejam devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos microrganismos. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos produtivos (JOO, CHANG, 2005). Nesse sentido, a utilização de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, é uma alternativa para reduzir os custos da produção de metabólitos por via microbiana (BOCCHINI et al., 2005).

As proteases microbianas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas de aplicação industrial devido a sua grande atividade catalítica e elevada especificidade, atingindo 60% do mercado de enzima mundial, com o domínio de mercado concentrado em poucas empresas (MOREIRA et al., 2002; GERMANO et al., 2003). Segundo David et al. (2009), o mercado de enzimas no mundo cresceu em média 7,6% ao ano, a partir de 2007, e atingirá em 2011 cifras em torno de US \$ 6 bilhões.

Diversos fatores (linhagens de microrganismo, fisiologia microbiana, sistema de produção, purificação, substrato, dentre outros) interferem na produção e estabilidade dessas enzimas (KOKA, WEIMER, 2000; POZA et al., 2001; PASTORE, 2002; STONER et al., 2004; RODARTE, 2005). Para se obter novos isolados que tenham maior ação catalítica e também para otimizar a produtividade e estabilidade de proteases; novas pesquisas com bactérias, leveduras e fungos filamentosos proteolíticos são realizadas (KITANO et al., 2002; AZEREDO et al., 2004; UPADHYAY et al., 2010).

Proteases oriundas do gênero *Bacillus* fazem parte de 20% do mercado de enzimas, com predominante aplicação em detergentes (KAUR et al., 2001; BAKHTIAR et al., 2002; GERMANO et al., 2003; GHORBEL, SELLAMI-KAMOUN, NASRI, 2003; NINGTHOUJAM et al., 2009), devido a sua capacidade de secretar grandes quantidades de proteína no meio (CHRISTIANSEN, NIELSEN, 2002). Com a maior utilização das enzimas na indústria, surge a necessidade de proteases mais específicas que atuem em determinados substratos sem interferir em outros e que possuam características determinadas para o processo em que serão empregadas (NOVOZYMES, 2010).

Espécies do gênero *Bacillus* apresentam um elevado potencial biotecnológico para produção tanto de proteases alcalinas como de biossurfactantes (INOH et al., 2001; JOO, CHANG, 2005; RAMNANI, KUMAR, GUPTA, 2005; SILVA, DELATORRE, MARTINS, 2007; NIKEREL, ATES, ONER, 2008; HADDAR et al., 2009; HADDAR et al., 2010).

A produção, utilização e descarte de petróleo e derivados têm gerado desequilíbrios ambientais de proporções mundiais, como a contaminação do solo e mananciais de água (NITSCHKE, PASTORE, 2002). Essas questões têm fomentado nos últimos anos, investigações na linha de produtos metabolizados por microrganismos, em resposta à necessidade de substituição dos surfactantes sintéticos derivados do petróleo por biossurfactantes (SARUBBO et al., 2006; LUNA, SARUBBO, CAMPOS-TAKAKI, 2008).

A utilização de biossurfactante tem sido cada vez mais aceita no mercado devido a sua vasta aplicação; são constituídos por moléculas de ácidos graxos, lipídios neutros, glicolipídios, lipossacarídios, fosfolipídios e lipopeptídios (LANG, 2002; MAIER, 2003; BARROS, QUADROS, PASTORE, 2008; NGUYEN, SABATINI, 2011; XU et al., 2011). Essas biomoléculas são aplicadas em indústrias de detergentes, alimentícias, farmacêuticas; tratamento de efluentes, remoção de óleo em tanques de navios e biorremediação em derramamentos de petróleo e derivados (BANAT, MAKKAR, CAMEOTRA, 2000; CAMEOTRA, MAKKAR, 2004; XU et al. 2011).

A presente pesquisa teve como objetivo a produção de proteases e biossurfactantes por cultivo submerso do *Bacillus licheniformis* UCP-1014, utilizando como fontes de carbono e nitrogênio, resíduos agro-industriais.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Microrganismo

Uma cultura de *Bacillus licheniformis* UCP-1014 foi utilizada como microrganismo produtor de proteases e biossurfactantes. Para a manutenção da bactéria, foi utilizado o meio Ágar Nutriente (AN) com a seguinte composição (por litro): Extrato de carne (5,0 g), Peptona (10,0 g), NaCl (5,0 g), Agar (15,0g), a pH 7,0. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.4.2 Preparação e crescimento do inóculo

Culturas jovens da bactéria obtidas após 24 h de cultivo em meio AN foram transferidas para frasco de Erlenmeyer de 125 mL, contendo água estéril cujas suspensões de células foram utilizadas como inóculos, quando apresentaram 10^6 UFC/mL. A contagem em placa foi realizada pela técnica pour plate com o meio de cultura AN e as colônias com 12 h de cultivo a 37 °C.

2.4.3 Meio de cultivo

A produção de proteases foi inicialmente realizada em meios utilizando diferentes fontes de carbono a 0,5% em caldo nutritivo (Extrato de carne (5,0 g), Peptona (10,0 g), NaCl (5,0 g), a pH 7,0) por litro, em triplicatas.

Diferentes fontes de nitrogênio foram investigadas para produção de proteases e biossurfactantes na presença da fonte de carbono selecionada. A concentração final de cada fonte de nitrogênio no meio de cultivo foi 0,5%, utilizando a fonte de carbono na presença de cloreto de cálcio 1 g/L e K_2HPO_4 1 g/L a pH 7,0.

Na investigação da influência do pH na produção de proteases, foram preparados meios de cultivo utilizando as fontes de carbono e de nitrogênio selecionadas em pH 7,5, 8,5 e 9,5, ajustados após esterilização.

Os meios de cultivo para investigação da produção de proteases foram autoclavados a 121 °C por 20 minutos, distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 250 mL com volume útil de 50–100 mL. Os cultivos foram inoculados com 10% v/v de inóculo e mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 37 °C. Amostras do líquido metabólico foram centrifugadas a uma velocidade orbital de 5000 rpm por 10 min para decantar as células suspensas. As fases sobrenadantes das amostras foram submetidas às seguintes determinações analíticas: pH, atividade proteolítica e tensão superficial.

2.4.4 Determinação de atividade proteolítica

O método de Leighton et al. (1973) foi utilizado para determinação de atividade proteolítica na presença de azocaseína 0,2%, como substrato, em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 7,2. A metodologia foi modificada: 0,15 mL da amostra (líquido metabólico/enzima comercial) foi inoculada no substrato e incubada por 10 minutos a 37 °C, sendo a reação interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 10%. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 rpm, a 4 °C. Um volume de 0,5 mL de cada sobrenadante foi transferido para cubetas contendo 0,5 mL de hidróxido de sódio 1M. O ensaio foi realizado em duplicata e o branco, preparado com o líquido metabólico previamente desnaturado. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 440 nm. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorvância igual a uma unidade, sendo expressa em U/mL.

2.4.5 Determinação de tensão superficial

A tensão superficial do líquido metabólico isento de células, obtido de cada cultivo, após centrifugação, foi medida em um tensiômetro automático (Modelo

Sigma 70, KSV Ltd., Finlândia), utilizando o anel de du Nuoy de acordo com a metodologia descrita por Kuyukina et al. (2005).

2.4.6 Ultrafiltração

A ultrafiltração por membrana filtrante plana Pellicon XL (Millipore) de porosidade 10 kDa (Figura 1), foi utilizada para concentrar o líquido metabólico livre de células. A amostra, separada em retentado (concentrado) e permeado, foi concentrada 20 vezes, utilizando uma pressão na amostra de 2,5 bar. A ultrafiltração foi realizada no laboratório da Bioenzima (Caruaru – PE) .



Figura 1 Equipamento de ultrafiltração

2.4.7 Efeitos de pH e temperatura na estabilidade de proteases

O pH ótimo para atividade das enzimas foi determinado no retentado com 0,1% de caseína como substrato, preparado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7-8) e tampão glicina - NaOH 0,1 M (pH 8-9). A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para determinação da estabilidade ao pH, o concentrado foi previamente ajustado com soluções tampões com valores de pH, variando entre 7 e 9. Em

seguida, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática nos seguintes intervalos de tempo 30, 60 e 90 minutos.

A estabilidade da atividade enzimática quanto à temperatura foi determinada pela inoculação do extrato enzimático concentrado em 0,1% de caseína a pH ótimo sob diferentes temperaturas, variando entre 40 e 90 °C por períodos de 30, 60 e 90 min. A atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente.

2.4.8 Formulação do líquido metabólico

Ao líquido metabólico concentrado (retentado) por membrana Millipore, foram adicionados conservante microbiológico (Sorbato de Sódio) e produtos químicos estabilizadores de enzimas (Glicerol, A e B), visando investigar a estabilidade por 10, 20 e 30 dias de armazenagem à temperatura ambiente de 28 °C. Um planejamento fatorial em dois níveis com quatro repetições no ponto central foi proposto para determinar o tempo de prateleira do produto final (tabela 1).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Investigação de fontes de carbono para produção de proteases

Os resultados de atividades proteolíticas determinados em cultivo submerso de *B. licheniformis* UCP-1014 em caldo nutritivo na presença de diferentes resíduos agro-industriais, estão ilustrados na figura 2.

Os resultados mostraram que a cultura de *B. licheniformis* UCP-1014 produziu atividade proteolítica em todas as condições investigadas. A maior atividade proteolítica foi de 226 U/mL em 24 h de cultivo submerso, utilizando o melaço como fonte de carbono.

O melaço de cana de açúcar é um subproduto agro-industrial da produção de açúcar que apresenta na sua composição química, cerca de 20% de água e 50%

de açúcares totais, contendo também cinzas, proteínas e lipídeos; logo esse resíduo é rico em nutrientes que justificam o reaproveitamento na metabolização por microrganismos para obtenção de enzimas, produto de valor agregado (BORZANI et al., 2001; SAID, PIETRO, 2004).

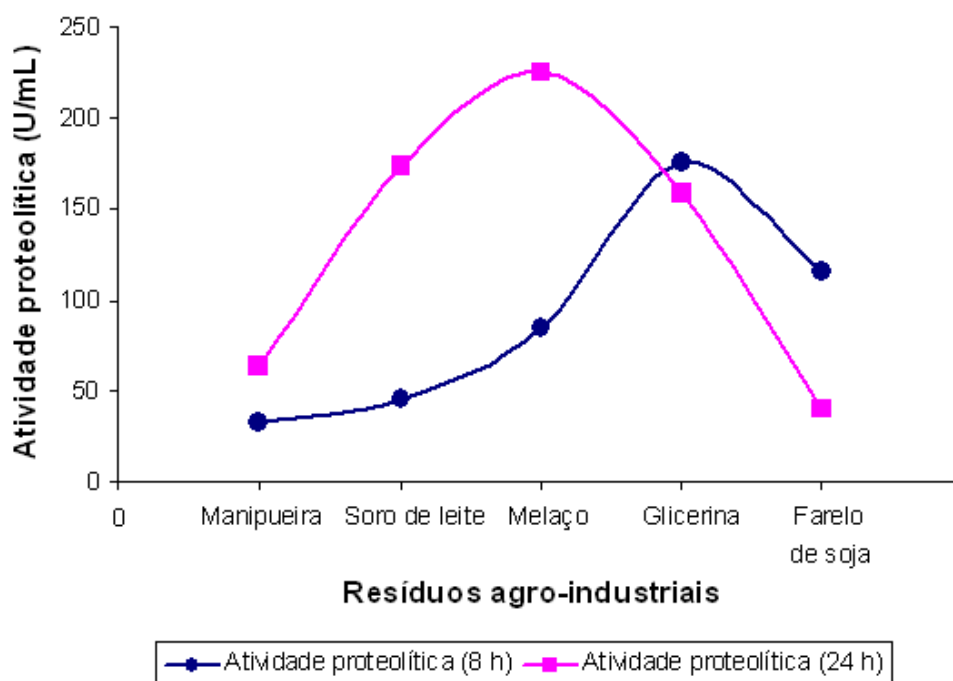


Figura 2 Produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014 em diferentes resíduos industriais

Shikha, Sharan e Darmwal (2007) cultivaram a bactéria *Bacillus pantotheneticus* na presença de melaço 1%, extrato de leveduras 1% e peptona 1%, a pH 10, durante 48 h em cultivo submerso a 120 rpm a 40 °C. Esses autores obtiveram atividade proteolítica de 242 U/mL, valor semelhante aos obtidos com a cultura de *B. licheniformis* UCP-1014 (226 U/mL) neste trabalho.

Silva, Delatorre e Martins (2007) identificaram que o *Bacillus* sp cepa SMIA-2 foi capaz de utilizar diversas fontes de carbono em cultivo submerso, porém o amido e a maltose foram as melhores fontes para a secreção de proteases e crescimento do organismo. Ao estudarem a produção de proteases, contendo maltose 1% suplementada com proteínas de soro 0,1% e água de maceração de milho 0,3% determinaram o máximo de atividade em 14 h, com níveis de 42 U/mg de proteínas, a pH 7,5 e a 50 °C; Esses autores utilizaram a metodologia de Nascimento e Martins (2004), segundo a qual uma unidade foi definida como a

quantidade da enzima necessária para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos, isto é os valores são dez vezes maiores que os determinados na metodologia deste trabalho. Logo, para que os resultados de produção de proteases sejam comparados, é fundamental que seja especificada a definição da atividade.

O pH do meio de cultivo submerso do *B. licheniformis* UCP-1014 durante a investigação da fonte de carbono apresentou pequenas variações. Após a esterilização dos meios, esse parâmetro físico-químico foi ajustado para pH 7,0. A figura 3 ilustra o comportamento desse parâmetro na presença dos diversos resíduos investigados. Com 8 h de cultivo foi determinado pH 5,5 nos cultivos utilizando melaço cujo valor aumentou com 24 h, atingindo pH 6,4. Na presença de soro de leite e manipueira, esse parâmetro físico-químico permaneceu em torno de pH 7,0 até 8 h de cultivo, aumentando gradativamente com o tempo até atingir pH 8,2 com 24 h.

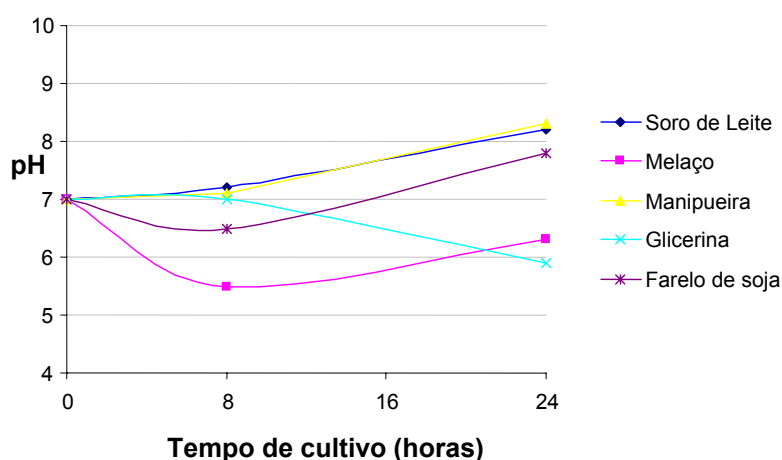


Figura 3 Valores de pH durante o cultivo submerso de *B. licheniformis* UCP-1014 em diferentes resíduos industriais

2.5.2 Seleção de fonte de nitrogênio

Os resultados do cultivo de *B. licheniformis* UCP-1014 usando diferentes fontes de nitrogênio (uréia, extrato de leveduras, peptona, nitrato de sódio e sulfato de amônio) na presença de melaço como fonte de carbono, estão ilustrados na

figura 4. As maiores atividades proteolíticas atingiram valores acima de 80 U/mL com 24 h de cultivo, independente da fonte de nitrogênio (uréia e peptona) na presença de melaço.

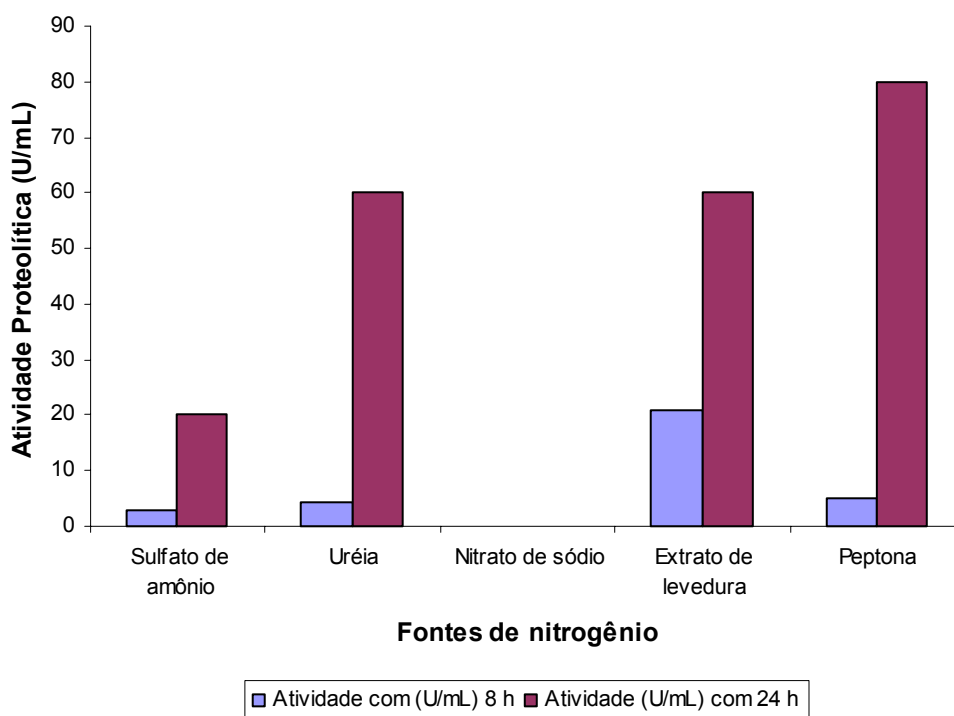


Figura 4 Produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melaço e de diferentes fontes de nitrogênio

Considerando que a diferença foi muito pequena entre os valores de atividades proteolíticas determinadas (Figura 4), a uréia foi selecionada por ter apresentado atividade enzimática elevada e por existir no mercado como fertilizante, um insumo de baixo valor econômico (R\$ 610,00 a 1180,00 por tonelada), enquanto o preço de 500 g de peptona bacteriológica varia de 199,00 a R\$ 293,00 (MFRURAL, CENTERLAB, SUPRALAB, 2010).

A uréia comercial é um composto orgânico sólido de cor branca, solúvel em água; por ser classificada como amida, é um composto nitrogenado não protéico, contendo ferro e chumbo em quantidades não tóxicas. A composição percentual da uréia comercializada no Brasil apresenta 46,4% de nitrogênio (SANTOS, CAVALIERI, MODESTO, 2001).

Srividya e Mala (2010) estudaram a Influência de parâmetros no processo de produção de protease alcalina e de detergente por um isolado de *Bacillus* sp. Y. O efeito de diferentes fontes de nitrogênio: cloreto de amônio (NH_4Cl), nitrato de potássio (KNO_3), nitrato de sódio (NaNO_3), sulfato de amônio (NH_4SO_4), fosfato de amônio (NH_4PO_4), uréia (NH_2) $_2\text{CO}$, extrato de carne e triptona foi investigado na concentração de 0,5%. Os experimentos foram realizados na presença de amido durante 72 h a 37 °C, sob agitação a 150 rpm e pH inicial 7,5. Ao final da investigação, o ensaio contendo uréia como fonte de nitrogênio apresentou 75% da atividade proteolítica máxima, determinada na presença de caseína.

A figura 5 ilustra os valores de pH no cultivo de *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melaço, utilizando diferentes fontes de nitrogênio. Pode-se ressaltar que esse parâmetro físico-químico foi ajustado para condição de neutralidade no início dos ensaios em todos os cultivos, após esterilização dos meios. Na presença da uréia, esse parâmetro aumentou para pH 8,3 com 8 h de cultivo, diminuindo para pH 7,5 com 24 h. Nos demais experimentos, o pH diminuiu no início do experimento, atingindo a faixa de pH 4,7 - 5,4 cujos valores permaneceram na mesma faixa de pH até o final do experimento. As maiores atividades proteolíticas foram determinadas tanto em meio ácido como em meio neutro, o que sugere que, a cultura de *B. licheniformis* UCP-1014 não produziu proteases alcalinas nas condições investigadas.

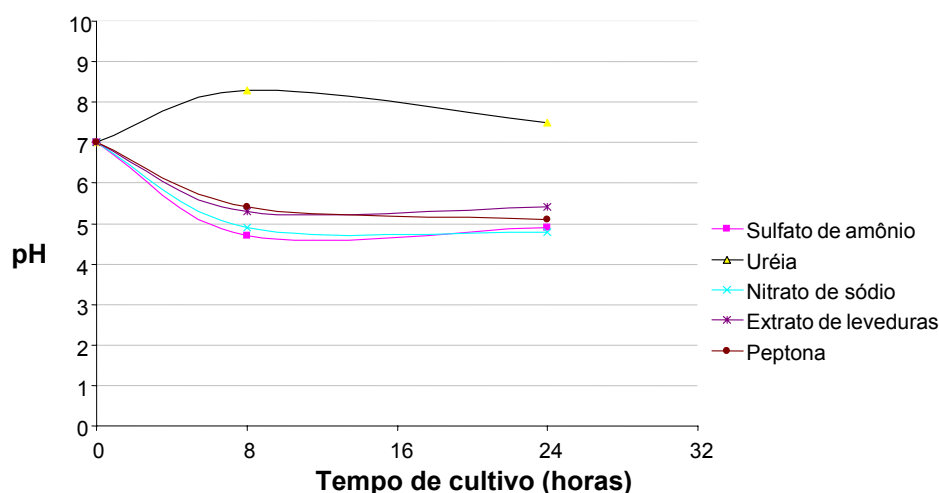


Figura 5 Valores de pH no cultivo submerso de *B. licheniformis* na presença de diferentes fontes de nitrogênio

El Enshasy et al. (2008) e Paladino (2008) determinaram atividades máximas de proteases produzidas por culturas diferentes de *B. licheniformis* em pH na faixa 7,5 - 7,6 enquanto Asokan e Jayanthi (2010) obtiveram os melhores resultados de atividade proteolítica em meio básico, pH 10. No entanto, proteases produzidas por *B. licheniformis* BBRC 100053 apresentaram pH ótimo 8 e estabilidade máxima na faixa de pH 7,0 – 8,0 (NEJAD, YAGHMAEI, HOSSEINI, 2010). Ressalta-se que esses autores utilizaram diferentes composições químicas nos meios de produção, não participando o melação, como nutriente.

As bactérias do gênero *Bacillus* são descritas na literatura como grandes produtoras de biossurfactantes (MULLIGAN, 2005). Os *Bacillus subtilis*, em especial, são produtores de lipopeptídeos, como a chamada surfactina (BARROS et al., 2007). Concentrações de surfactina menores que 0,005 % reduzem a tensão superficial para 27 mN/m. No entanto a solubilidade e a capacidade surfactante da surfactina, depende do tipo de resíduo utilizado como substrato (BARROS et al., 2007).

A propriedade de maior importância para os agentes tensoativos é a tensão superficial que é a força de atração existente entre as moléculas dos líquidos (DE GUSMÃO et al., 2010; RUFINO et al., 2011). A tensão superficial diminui quando a concentração de surfactante no meio aquoso aumenta, ocorrendo a formação de micelas, que são moléculas anfipáticas agregadas com as porções hidrofílicas posicionadas para a parte externa da molécula e as porções hidrofóbicas para a parte interna (DE GUSMÃO et al., 2010; RUFINO et al. 2011). A tensão superficial também diminui quando a concentração de surfactante em um solvente não polar aumenta, ocorrendo formação de micelas reversas. Nos sistemas de micelas reversas, as cabeças polares dos anfílicos estão concentradas no interior do agregado e por esta razão formam um núcleo central hidrofílico (MANIASSO, 2001).

A figura 6 ilustra os valores das tensões superficiais dos líquidos metabólicos, durante o cultivo do *B. licheniformis* UCP-1014 por 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h em presença de melação e diferentes fontes de nitrogênio. As reduções das tensões superficiais determinadas nos cultivos de *B. licheniformis* UCP-1014 apresentou melhor resultado na presença nitrato de sódio (39,35 mN/m), como fonte de nitrogênio. As bactérias do gênero *Bacillus* são produtoras de agentes surfactantes efetivos na redução da tensão superficial do meio para valores em torno

de 28 mN/m. No entanto os resultados obtidos nas condições experimentais da presente pesquisa diferem da literatura. Embora os valores de tensão indiquem a presença de agentes tensoativos, é possível que tenha ocorrido a produção de agentes predominantemente emulsificantes (RUFINO et al., 2011).

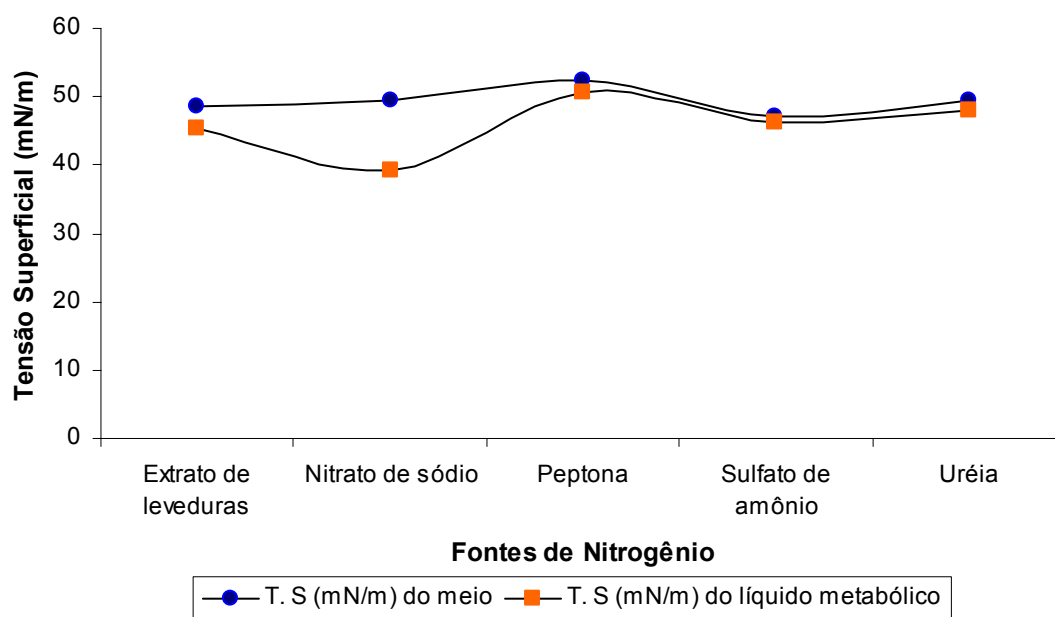


Figura 6 Tensão superficial do biossurfactante obtido por cultivo submerso de *B. licheniformis* UCP-1014 em presença de melaço e diferentes fontes de nitrogênio

Apesar do nitrato de sódio ter sido a fonte de nitrogênio promissora na produção de biossurfactantes (figura 6), não foi determinada atividade proteolítica no cultivo de *B. licheniformis* UCP-1014 na presença dessa fonte de nitrogênio sob as condições investigadas. Considerando que a produção de proteases ocorreu em pH neutro e que a fonte de nitrogênio que obteve produção máxima dessas enzimas não coincidiu com a fonte correspondente à menor tensão superficial do líquido metabólico (produção de biossurfactante), investigações subseqüentes foram direcionadas apenas para produção de proteases.

2.5.3 Planejamento fatorial 2^4 para investigação dos componentes do meio de produção de proteases

A tabela 2 apresenta os fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^4 para investigar a influência das concentrações de melação, uréia, fosfato dibásico de potássio (K_2HPO_4) e cloreto de cálcio ($CaCl_2$) na produção de proteases em cultivo do *B. licheniformis* UCP - 1014.

Tabela 1 Fatores e níveis do planejamento fatorial completo 2^4

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Melaço (%)	1,0	3,0	5,0
Uréia (%)	0,1	0,3	0,5
K_2HPO_4 (%)	0,0	0,1	0,2
$CaCl_2$ (%)	0,0	0,1	0,2

A tabela 3 apresenta os vinte ensaios do planejamento, sendo quatro no ponto central, e os resultados obtidos para a variável resposta, atividade proteolítica, determinada com 24, 48 e 72 h de cultivo submerso.

Tabela 2 Matriz decodificada e resultados de atividade proteolítica do planejamento fatorial completo 2⁴

Ensaio	Fatores				Atividade Proteolítica (U/mL)		
	Melaço	Uréia	K ₂ HPO ₄	CaCl ₂	24 h	48 h	72 h
01	1	0,1	0,0	0,0	100	102	86
02	5	0,1	0,0	0,0	1	5	2
03	1	0,5	0,0	0,0	112	74	100
04	5	0,5	0,0	0,0	0	2	0
05	1	0,1	0,2	0,0	53	58	19
06	5	0,1	0,2	0,0	0	8	0
07	1	0,5	0,2	0,0	50	43	18
08	5	0,5	0,2	0,0	0	0	0
09	1	0,1	0,0	0,2	93	91	92
10	5	0,1	0,0	0,2	0	0	16
11	1	0,5	0,0	0,2	93	95	99
12	5	0,5	0,0	0,2	0	4	7
13	1	0,1	0,2	0,2	28	30	15
14	5	0,1	0,2	0,2	0	4	70
15	1	0,5	0,2	0,2	20	19	12
16	5	0,5	0,2	0,2	4	0	0
17	3	0,3	0,1	0,1	41	33	26
18	3	0,3	0,1	0,1	65	35	34
19	3	0,3	0,1	0,1	61	25	8
20	3	0,3	0,1	0,1	39	35	22

A maior atividade proteolítica determinada no cultivo submerso do *B. licheniformis* UCP-1014 atingiu 112 U/mL na presença de melaço 1% e uréia 0,5%, com 24 h de cultivo (tabela 3). O fator tempo na produção em grande escala é estratégico no cálculo dos custos do processo, devendo ser o menor possível para que a produtividade seja máxima. A redução do tempo de produção diminui os riscos de contaminação dos meios de cultivo e conseqüentes perdas durante o processo. Com a otimização do fator tempo a continuidade da investigação da produção de proteases desse trabalho se torna promissora.

A maior produção de proteases (ensaio 3) foi independente da presença do sal de fosfato e de íons cálcio. Ressalta-se que o melação contém em sua composição espécies químicas como: íons cálcio, magnésio, fósforo e metais pesados, porém, alguns de seus componentes podem atuar na indução ou inibição da produção de proteases e, dificultar o processo de recuperação e purificação (FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

A influência dos fatores nos resultados da atividade de proteases determinados com 24 e 48 h, respectivamente, foi investigada com nível de confiança em torno de 95%. Resultados semelhantes (não ilustrados) foram obtidos com 72 h de cultivo.

A variável de maior influência na produção de proteases foi a quantidade de melação. A interação entre melação e fosfato no meio de cultivo foi estatisticamente significativa, como pode ser observada nos diagramas de Pareto, ilustrados nas figuras 7 e 8.

De acordo com os diagramas de Pareto, nas condições estudadas, o aumento das concentrações de melação e de fosfato exerceram efeitos negativos, estatisticamente muito significativos sobre a produção de proteases, isso é, não favoreceram o aumento da atividade de proteases.

Por outro lado, nas condições estudadas, a interação entre melação e fosfato sobre a produção desse biocatalisador apresentou efeito positivo significativo (Figuras 7 e 8). Planejamentos fatoriais subseqüentes devem ser realizados visando à otimização do meio de produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014, para investigar concentrações de melação inferiores a 1% na presença de uréia e de fosfato.

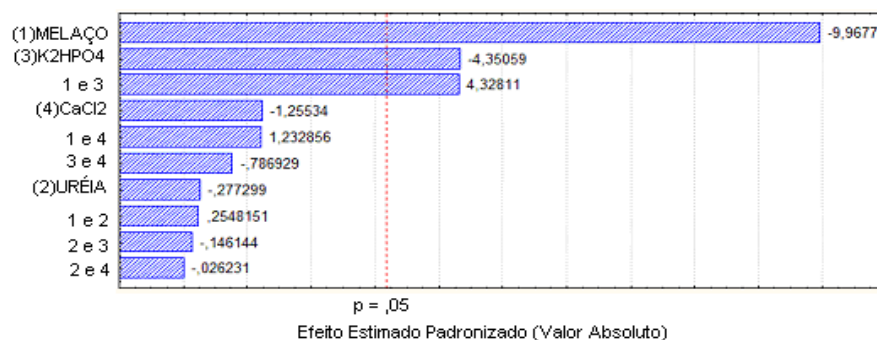


Figura 7 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios em resposta da produção de proteases com 24 h de cultivo submerso do *Bacillus licheniformis* UCP-1014

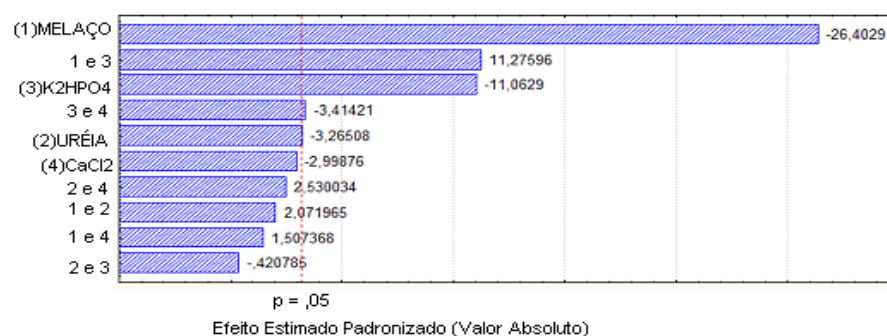


Figura 8 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios em resposta da produção de proteases com 48 h de cultivo submerso do *Bacillus licheniformis* UCP-1014

A cultura de *B. licheniformis* UCP-1014, cultivada na presença de melãoço 1% e uréia 0,5% com 24 h de cultivo apresentou pH na faixa entre 7,2 e 7,6. Essa condição foi utilizada na produção de proteases visando à concentração e formulação do líquido metabólico com atividade proteolítica para investigação da estabilidade do produto final.

2.5.4 Influência do pH do meio de cultivo na presença de melãoço e uréia

A tabela 3 apresenta os resultados de atividade proteolítica determinados em cultivo submerso do *B. licheniformis* UCP-1014, utilizando melãoço 1% e uréia 0,5% na produção de proteases com 24 h de cultivo submerso para diferentes valores de pH inicial do meio. A maior atividade proteolítica foi determinada com o pH inicial 7,5, atingindo 166 U/mL em pH 7,8 após 24 h de cultivo.

Tabela 3 Produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melãoço 1% e uréia 0,5% em função do pH inicial do meio de cultivo

pH inicial do meio de cultivo	Atividade proteolítica (U/mL)	pH do líquido metabólico com 24 h
7,5	166	7,8
8,5	118	8,2
9,5	129	8,8

A literatura apresenta resultados semelhantes relativos aos valores de pH inicial e final durante a produção de proteases. Sangeetha, Geetha e Arulpandi (2008) produziram proteases em meio contendo glicose 1%, peptona 0,5%, cloreto de sódio (NaCl) 0,5%, extrato de levedura 0,3%, cloreto de cálcio (CaCl₂) 0,04% e cloreto de magnésio (MgCl₂) 0,02%, com o pH inicial ajustado para 7. A amostra foi incubada a 37 °C sob agitação de 180 rpm, atingindo atividade proteolítica máxima de 52 U/mL com 36 h de cultivo, em pH 8.

Vários autores também têm determinado atividade proteolítica máxima em meio alcalino. Ahmed et al. (2010) investigaram o efeito do pH inicial na produção de proteases por *Bacillus subtilis* em fermentação submersa, ajustando os pHs dos meios para o início do cultivo, na faixa de 7 a 12; esses autores determinaram atividade proteolítica máxima 133 U/mL em pH 11, utilizando diferentes fontes de carbono e de nitrogênio. Quando o cultivo foi ajustado a pH 7, foi determinada uma redução de 50 % da atividade máxima.

Segundo Sarkar, Cook e Owens (1993, apud AHMED et al., 2010), o aumento do pH dos meios de cultura investigados ocorreu possivelmente devido à liberação de proteases e amônia; o que indica uma forte influência da secreção de enzimas na variação do pH inicial do meio de produção.

2.5.5 Ultrafiltração do líquido metabólico produzido por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melaço e uréia

O líquido metabólico livre de células, obtido no cultivo de *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melaço 1% e uréia 0,5%, foi concentrado vinte vezes por ultrafiltração (figura 9). As atividades proteolíticas determinadas no retentado e no permeado atingiram os valores de 957 e 96 U/mL, respectivamente. Comparando esses valores, ficou evidenciado que, 90% da atividade proteolítica permaneceu no concentrado, sendo que 10% da atividade foi removida com o permeado.

O líquido metabólico antes de ser filtrado apresentou atividade proteolítica máxima igual a 112 U/mL. Como esse líquido metabólico foi concentrado vinte vezes por ultrafiltração pela membrana de 10 kDa, a atividade de proteases deveria ter aumentado na mesma proporção. No entanto a atividade máxima determinada no

retentado 957 U/mL, indicou uma perda de mais de 50% da atividade enzimática do concentrado. Logo, a ultrafiltração forneceu um produto concentrado, porém estruturas químicas que estabilizavam as proteases foram arrastadas durante o processo para o permeado.

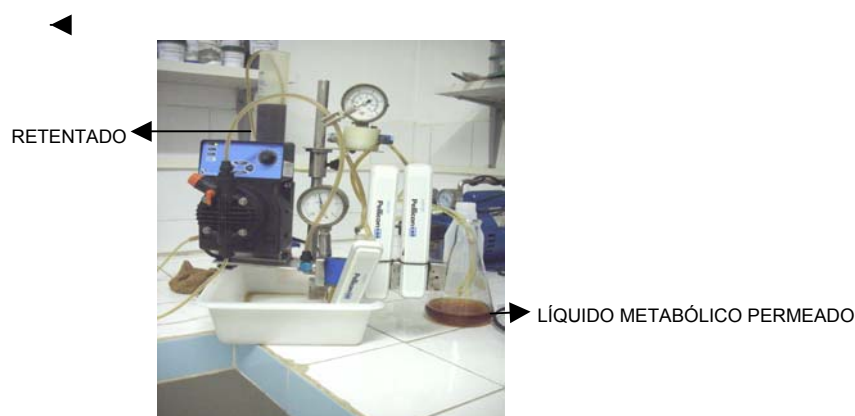


Figura 9 Ultrafiltração do líquido metabólico de *B. licheniformis* UCP-1014

2.5.6 Estabilidade do retentado de proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 após incubação em diferentes pHs

A amostra controle do líquido metabólico livre de células e concentrado vinte vezes do *B. licheniformis* UCP-1014 apresentou atividade enzimática igual a 763 U/mL em pH 7, no tempo zero da investigação da estabilidade.

A figura 10 apresenta os resultados de atividade enzimática determinados após incubação por 30, 60 e 90 min na presença de diferentes pHs (tampões diferentes).

O líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica produzida por *B. licheniformis* UCP-1014 foi muito estável na faixa de pH variando entre 7 e 9. As retenções de atividades proteolíticas variaram em torno de 95 – 97% com 30 min de incubação na faixa de pH investigada, utilizando os tampões fosfato e glicina – NaOH. Quanto maior o tempo de incubação em diferentes pHs, foram menores as retenções da atividade. Com 60 min foram determinados valores de retenção de

atividade na faixa de 89 a 92%, enquanto que, com 90 min de incubação, a maior retenção foi de 55% em pH 8, utilizando tampão glicina.

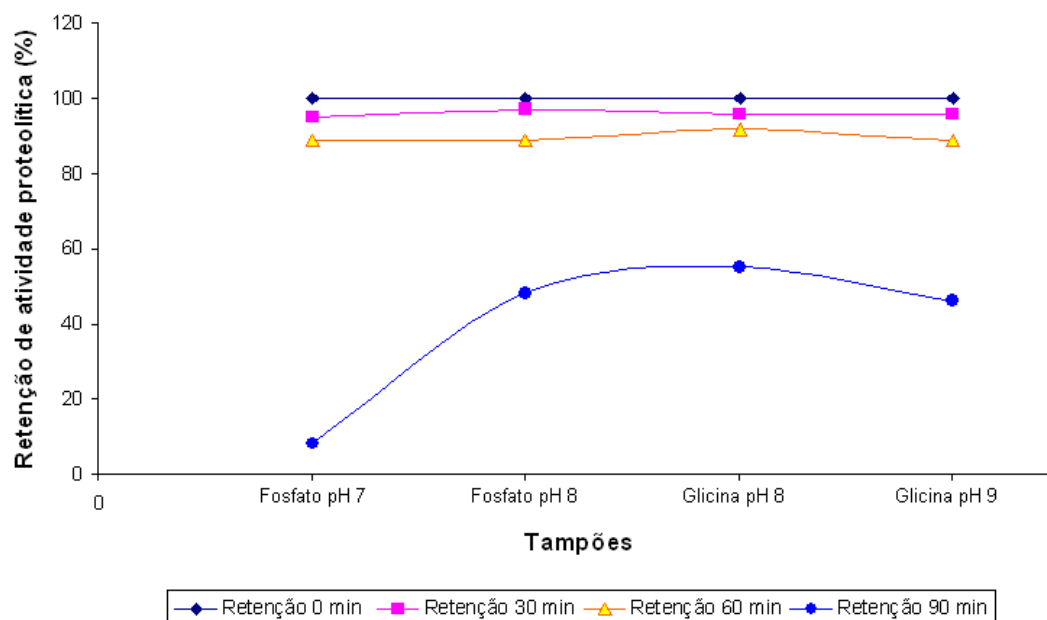


Figura 10 Estabilidade do retentado de proteases após incubação em diferentes pHs durante 30, 60 e 90 min

Haddar et al. (2009) cultivaram *Bacillus mojavensis* A21 na presença de resíduos de trigo, peptona, extrato de leveduras, íons cálcio e íons fosfato, tendo determinado atividade proteolítica estável quando o líquido metabólico purificado foi incubado na faixa de pH 7 a 12 em diferentes tampões.

Usharani e Muthuraj (2010) investigaram a estabilidade de proteases produzidas por *Bacillus laterosporus* em diferentes pHs; esses autores observaram que a retenção de atividade máxima foi a pH 7, tendo sido evidenciado que a atividade diminuiu à medida que o pH aumentou (até pH 11), quando o líquido metabólico foi incubado nos tampões glicina-NaOH e fosfato por 24 h na temperatura ambiente.

A atividade proteolítica produzida por *B. licheniformis* UCP-1014 foi estável na faixa de pH de 7 a 9, retendo cerca de 90% da atividade enzimática durante 60 min de incubação.

2.5.7 Estabilidade do retentado de proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 em função de incubação sob temperaturas diferentes

A amostra controle do líquido metabólico livre de células e concentrado vinte vezes apresentou no tempo zero da investigação da estabilidade em diferentes temperaturas atividade proteolítica em torno de 630 U/mL. A figura 11 apresenta os percentuais de retenção determinados após incubação por 30, 60 e 90 min sob diferentes temperaturas em pH 7.

O líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica produzida por *B. licheniformis* UCP-1014 diminuiu a atividade relativa à medida que a temperatura e o tempo de incubação aumentaram. As retenções de atividade foram elevadas, atingindo 92 e 84% quando a temperatura variou de 40 a 90 °C, respectivamente, durante 90 min de incubação do líquido metabólico na ausência do substrato. Logo, o líquido metabólico concentrado do *B. licheniformis* UCP-1014 apresentou grande estabilidade térmica.

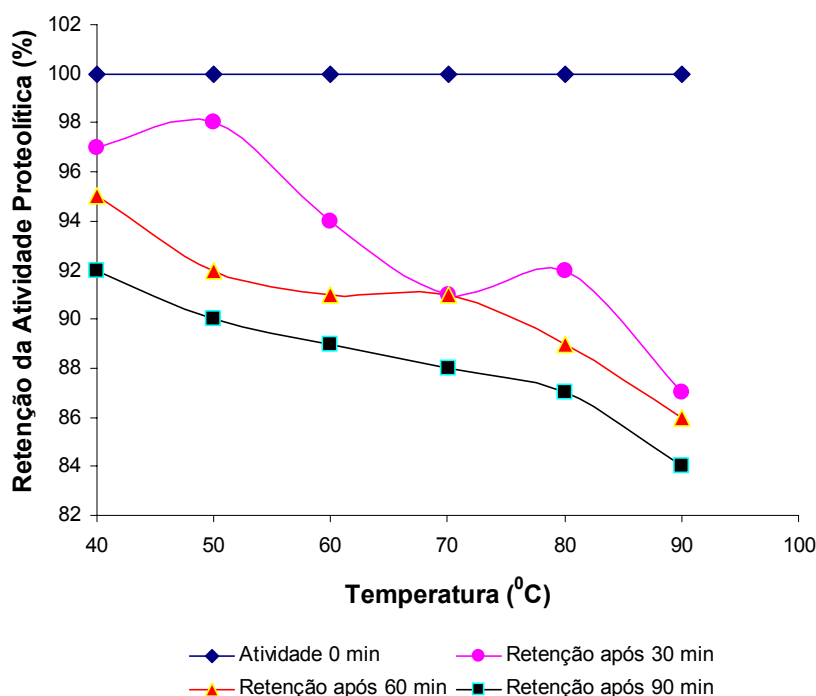


Figura 11 Estabilidade do retentado de proteases após incubação em diferentes temperaturas durante 30, 60 e 90 min

Haddar et al. (2009) determinaram a termoestabilidade de proteases produzidas por *Bacillus mojavensis* A21; os autores evidenciaram o aumento significativo da atividade proteolítica pela adição de cloreto de cálcio durante a incubação do líquido metabólico purificado.

Usharani e Muthuraj (2010) investigaram a estabilidade do líquido metabólico livre de células a pH 7,5, produzido por *Bacillus laterosporus* por incubação a temperaturas de 30 a 100 °C durante 2 h; foi observado que a retenção máxima de atividade foi determinada a 40 °C e que a 90 °C, a atividade atingiu apenas 30 % do valor inicial.

2.5.8 Planejamento fatorial 2³ na formulação do retentado do líquido metabólico contendo atividade proteolítica

A tabela 6 apresenta a matriz decodificada das substâncias químicas estabilizadoras de enzimas e a variável resposta atividade proteolítica determinada com 10, 20 e 30 dias de armazenagem. A atividade proteolítica do líquido metabólico controle (formulado) foi 763 U/mL no início do experimento.

Foi verificado que o líquido metabólico concentrado, conservado com sorbato de sódio 0,2% e formulado, apresentou estabilidade máxima quando armazenado a 28 °C durante 20 dias. Foi retida cerca de 100% da atividade proteolítica na presença de glicerol 2,5% e das substâncias comerciais estabilizadoras de enzimas (A e B) 7,5%, correspondendo ao ponto central do planejamento fatorial (ensaios 9, 10, 11 e 12). Nesses ensaios, a média da atividade proteolítica foi 758 U/mL.

Valores de atividades proteolíticas maiores do que no tempo zero foram obtidos em outros ensaios (tabela 4). Logo, todas as três substâncias adicionadas na formulação do líquido metabólico influenciaram na estabilidade do produto final. No entanto de acordo com o diagrama de Pareto (figura 12), a substância estabilizadora A influenciou com significância estatística a atividade proteolítica.

Tabela 4 Atividades proteolíticas do retentado na presença de substâncias estabilizadoras determinadas com 10, 20 e 30 dias de armazenagem a 28 °C

Ensaio	Fatores (%)			Retenção da atividade proteolítica (%)			
	glicerol	Estabilizador		atividade (U/mL) tempo 0h	10 dias	20 dias	30 dias
A	B						
1	0	5	5	763	85	77	31
2	5	5	5	810	90	99	24
3	0	10	5	868	81	100	39
4	5	10	5	880	87	100	10
5	0	5	10	763	89	89	176
6	5	5	10	780	79	98	33
7	0	10	10	826	95	100	38
8	5	10	10	880	79	100	35
9	2,5	7,5	7,5	770	90	96	38
10	2,5	7,5	7,5	774	90	100	52
11	2,5	7,5	7,5	773	93	97	49
12	2,5	7,5	7,5	771	88	100	51

Essa substância estabilizadora A foi a única variável que apresentou efeito estatisticamente significativo ao nível de confiança de 95%, sobre a atividade proteolítica (com 20 dias de armazenamento) do líquido metabólico concentrado, conservado e formulado. Considerando que o efeito dessa variável foi positivo, o aumento de sua concentração na formulação de líquido metabólico, favoreceu o aumento da estabilidade do retentado. Não apresentaram efeitos significativos, nem o aumento da concentração do glicerol, apesar de ter valor positivo, nem o aumento da concentração da substância estabilizadora B que apresentou efeito próximo a zero.

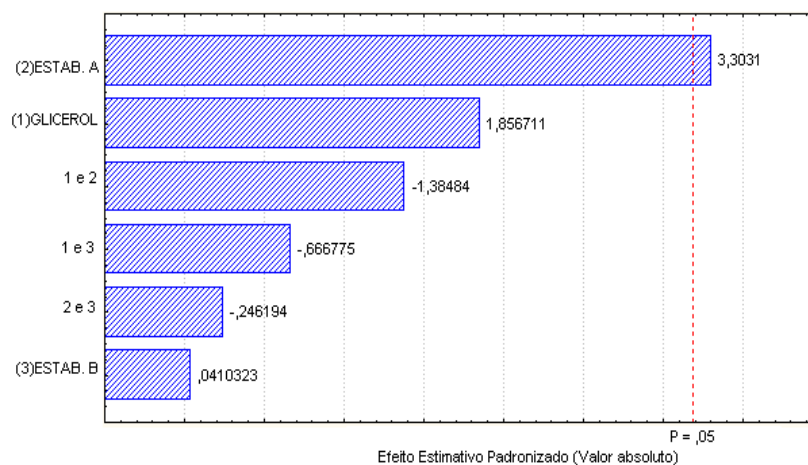


Figura 12 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise de fatores dos ensaios, em resposta à estabilidade da atividade proteolítica dos formulados com 20 dias de armazenamento a 28 °C, preparados a partir do retentado obtido por ultrafiltração e produzido por *B. licheniformis* UCP-1014 em cultivo submerso

No desenvolvimento de uma tecnologia de enzimas, o produto final a ser comercializado deve apresentar grande estabilidade ao armazenamento, mantendo a atividade enzimática. Considerando que houve redução de atividade proteolítica em torno de 60% no período de 30 dias de armazenamento do líquido metabólico do *B. licheniformis* UCP-1014 produzido na presença de melaço e uréia, é necessário que outros experimentos de formulação do líquido metabólico sejam propostos para investigar o efeito da adição de substratos cujas substâncias aumentam e estabilizam a atividade enzimática (VERMELHO et al., 2008).

2.6 CONCLUSÕES

- *B. licheniformis* UCP-1014 produz proteases na presença de melaço e uréia a pH 7,5 e 37 °C sob cultivo submerso.
- *B. licheniformis* UCP-1014 produz biossurfactante na presença de melaço de cana-de-açúcar.
- Proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 são concentradas por ultrafiltração.
- A estabilidade do retentado de proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014 na presença de melaço e uréia ocorre na faixa de pH 7 – 9 e entre 40 e 90 °C durante 90 min, na ausência do substrato.
- O retentado de proteases produzidas por *B. licheniformis* UCP-1014, formulado com sorbato de sódio, glicerol e substâncias comerciais estabilizadoras de enzimas retém a atividade inicial durante 20 dias de armazenamento a 28 °C.

2.7 REFERÊNCIAS

AHMED, I.; IRFAN, M.; NADEEM, M.; A. ZIA, M. A.; AHMAD, B. M.; IQBAL, H. M. N. Optimization of Media and Environmental Conditions for Alkaline Protease Production Using *Bacillus subtilis* in Submerged Fermentation Process. **IJAVMS**, Vol. 4, p. 105-113, 2010.

ASOKAN, S.; JAYANTHI, C. Alkaline protease production by *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans*. **Journal of Cell and Tissue Research**, v. 10, p. 2119-2123, 2010.

AZEREDO, L. A. I.; FREIRE, D. M. G.; SOARES, R. M. A.; LEITE, S. G. F.; COELHO, R. R. R. Production and partial characterization of thermophilic proteases from *Streptomyces sp* isolated from Brazilian cerrado soil. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 354-358, 2004.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potencial commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BAKHTIAR, S.; ANDERSSON, A. G.; MATTIASSON, B.; HATTI-KAUL, R. Stability characteristics of a calcium-independent alkaline protease from *Nesterenkonia sp*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 525-531, 2002.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em maniveira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 979-985, 2008.

BARROS, F. F. C.; BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, J. R.; PASTORE, G. M. **Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos**. Química Nova, v. 30, São Paulo, 2007.

BOCCHINI, D. A.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; GOMES, E.; SILVA, R. D.. Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3653-3659, 2005.

BORZANI, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia Industrial: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

CENTERLAB. Disponível em: < <http://www.centerlab.com.br>>. Acesso em: 07 mar. 2011.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro: FAPERJ/EPUB, 2008.

CHRISTIANSEN, T.; NIELSEN, J. Production of extracellular protease and glucose uptake in *Bacillus clausii* in steady state and transient continuous cultures. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 265-273, 2002.

DAVID, L.; VIERROS, M.; HAMON, G.; ARICO, S.; MONAGLE, C. Marine genetic resources: a review of scientific and commercial interest, **Mar Policy**, v. 33, p. 183 -194, 2009.

DE GUSMAO C. A. B, RUFINO, R. D, SARUBBO, L. A. Laboratory production and characterization of a new biosurfactant from *Candida glabrata* UCP1002 cultivated in vegetable fat waste applied to the removal of hydrophobic contaminant. **World J. Microbiology Biotechnology**, v. 26, p. 1683 –1692, 2010.

EL ENSHASY, H.; ABUOUL-ENEIN, A.; HELMY, S.; EL AZALY, Y. Optimization Of The Industrial Production Of Alkaline Protease By *Bacillus licheniformis* In Different Production Scales. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 2, p. 583-593, 2008.

FELIX, C. R.; NORONHA, E. F.; MARCO, J. L. Proteases – características e aplicações industriais. In: SAID, S.; PIETRO, R.C.L.R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p. 327-347, 2004.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C.R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp produced by solid-state fermentation, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246-251, 2003.

GHORBEL, B.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, p. 513-518, 2003.

HADDAR, A.; BOUGATEF, A.; AGREBI, R.; SELLAMI-KAMOUN, A.; NASRI, M. A novel surfactant-stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus mojavensis* A21. Purification and characterization. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 29-35, 2009.

HADDAR, A.; SELLAMI-KAMOUN, A.; FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HMIDET, N.; NASRI, M. Characterization of detergent stable and feather degrading serine proteases from *Bacillus mojavensis* A21. **Biochemical Engineering Journal**, v. 5, p. 53-63, 2010.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactants of MEL – A increase gene transfection mediated by cationic liposomes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 57-61, 2001.

JOO, H. S.; CHANG, C. S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. **Process**

Biochemistry, v. 40, p. 1263-1270, 2005.

KAUR, S.; VOHRA, R. M.; KAPOOR, M.; KHALIL, Q.; HOONDAL, G. S. Enhanced production and characterization of a highly thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. P-2. **World Journal of Microbiology e Biotecnologia**, v. 17, p. 125-129, 2001.

KITANO, H.; KATAOKA, K.; FURUKAWA, K.; HARA, S. Specific expression and temperature-dependent expression of the acid protease-encoding gene (pep A) in *Aspergillus oryzae* in solid state culture (rice-koji). **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 93, n. 6, p. 563-567, 2002.

KOKA, R.; WEIMER, B. C. Isolation and characterization of a protease form *Pseudomonas fluorescens* RO98. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 89, p. 280-288, Aug. 2000.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; MAKAROV, S. O.; LITVINENKO, L. V.; CUNNINGHAM, C. J.; PHILIP, J. C. Effect of biosurfactants on crude oil desorption and mobilization in a soil system. **Environment International**, v. 31, p. 155-161, 2005.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid e Interface Science**, v. 7, n. 1-2, p. 12-20, 2002.

LEIGHTON, T. J.; DOI, R. H.; WARREN, R. A. J.; KELLN, R. A. The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal Molecular Biology**, v. 76, p. 103-22, 1973.

LUNA, J.M.; SARUBBO, L. A.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. A new biosurfactant produced by *Candida glabrata* UCP1002: characteristics of stability and application in oil recovery. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. In press. 2008.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. In: BENNET, J. W.; LASKIN, A. I.; GADD, G. M. (Eds.). **Advances Applied Microbiology**, v. 52. USA: Academic Press. Cap. 4, p. 101-121, 2003.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, 2001.

MFRURAL. Disponível em: < <http://www.mfrural.com.br>>. Acesso em: 07 mar. 2011.

MOREIRA, K. A.; SILVA, A. C. J.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO-JÚNIOR, L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; CHAVES, A. C.; PORTO, A. L. F.; LIMA-FILHO, J. L. estudos preliminares das propriedades cinéticas da protease alcalina de *Nocardioopsis sp* In:

SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5., 2002, Brasília. **Anais....** Brasília, DF, 2002.

MOREIRA, K. A.; ALBUQUERQUE, B. F.; TEIXEIRA, M. F. S.; PORTO, A. L. F.; FILHO, J. L. LIMA. Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. **Word Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 307-312, 2002.

MULLIGAM, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v.133, p.183-198, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p. 91-96, 2004.

NEJAD, Z. G.; YAGHMAEI, S.; HOSSEINI, R. H. Production of Extracellular protease and determination of optimum condition by *Bacillus licheniformis* BBRC 100053, **Chemical Engineering Transactions**, v. 21, p. 1443 – 1447, 2010.

NIKEREL, I. E.; ATES, Ö.; ÖNER, E. T. Effect of bioprocess conditions on growth and alkaline protease production by halotolerant *Bacillus licheniformis* BA17. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, p.539-544, 2008.

NINGTHOUJAM, D. S.; KSHETRI, P.; SANASAM, S.; NIMAICHAND, S. Screening, Identification of Best Producers and Optimization of Extracellular Proteases from Moderately Halophilic Alkalithermotolerant Indigenous Actinomycetes. **World Applied Sciences Journal**, v. 7, p. 907-916, 2009.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NOVOZYMES. Disponível em: < <http://www.novozymes.com> >. Acesso em: 10 set. 2010.

NGUYEN, T. T.; SABATINI, D. A. Characterization and emulsification properties of rhamnolipid and sophorolipid biosurfactants and their applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 1232 – 244, 2011.

PALLADINO, F. Estudo da síntese de enzimas por *Bacillus licheniformis* E-44 em meio formulado à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 74 f, 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2008.

PASTORE, G. M. Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE BIOTECNOLOGIA ENZIMÁTICA, 5. , 2002, Brasília. **Anais...** Brasília, DF, 2002.

POZA, M.; MIGUEL, T.; SIERO, C.; VILLA, T. G. Characterization of a broad pH range protease of *Candida caseinolytica*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 916-921, 2001.

RAMNANI, P.; KUMAR, S. S.; GUPTA, R. Concomitant production and downstream processing of alkaline protease and biosurfactant from *Bacillus licheniformis* RG1: Bioformulation as detergent additive. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3352-3359, 2005.

RODARTE, M. P. **Atividade proteolítica de bactérias, leveduras e fungos isolados dos frutos e grãos de café (*Coffea arabica* L.)**. 2005. 86 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M., TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, p. 1-5, 2011.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Leggis Summa, p. 93-96, 2004.

SANGEETHA, R.; GEETHA, A.; ARULPANDI, I: Optimization of protease and lipase production by *Bacillus pumilus* SG 2 isolated from an industrial effluent. *The Internet Journal of Microbiology*, v. 5, 2008.

SANTOS, G. T.; CAVALIERI, F. L. B.; MODESTO, E. C. Recentes avanços em nitrogênio não protéico na nutrição de vacas leiteiras. In: 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE: Novos conceitos em Nutrição. **Anais...** Lavras, UFLA, 2001, p. 199-228.

SARUBBO, L. A.; LUNA, J. M.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a new strain of *Candida glabrata* UCP - 1002. **Electronic Journal Biotechnology**, v. 9, p. 400 - 406, 2006.

SHIKHA.; SHARAN, A.; DARMWAL, N. S. Improved production of alkaline protease from a mutant of alkalophilic *Bacillus pantotheneticus* using molasses as a substrate. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 881-885, 2007.

SILVA, C. R. da.; DELATORRE, A. B.; MARTINS, M. L. L. Effect of the culture conditions on the production of na extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, 2007.

SRIVIDYA, S.; MALA, M. Influence of process parameters on the production of detergent compatible alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. Y. **Turkish Journal of Biology**, v. 34, 2010.

STONER, M. R.; DALE, D. A.; GUALFETTI, P. J.; BECKER, T.; MANNING, M. C.; CARPENTER; RANDOLPH, W. Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent

formulations: effects of thermodynamic stabilizers and protease inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 34, p. 114-125, 2004.

SUPRALAB. Disponível em: < <http://www.supralab.com.br>>. Acesso em: 07 mar. 2011.

UPADHYAY, M. K.; KUMAR, R.; KUMAR, A.; GUPTA, S.; KUMARI, M.; SINGH, A.; JAIN, D.; VERMA, H. N. Optimization and characterization of an extracellular proteases from *Aspergillus flavus* MTCC 277. **African Journal of Agricultural Research**, v. 5, p. 1845-1850, 2010.

USHARANI, B.; MUTHURAJ, M. Production and characterization of protease enzyme from *Bacillus laterosporus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, p.1057-1063, 2010.

VERMELHO, A. B.; MELO, A. C. N.; SÁ, M. H. B.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M.; COURI, S.; BON, E. P. S. Enzimas proteolíticas: aplicações biotecnológicas. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia - Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Ed. Interciência, cap.11, p. 273-287, 2008.

XU, Q.; NAKAJIMA M.; LIU, Z.; SHIINA, T. Biosurfactants for microbubble preparation and application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 462-475, 2011.

CAPÍTULO 3

3.1 CONCLUSÕES GERAIS

- Resíduos agro-industriais podem ser reaproveitados por microrganismos como nutrientes para produção de metabólitos de valor econômico como, proteases e biossurfactantes diminuindo impacto ambiental e custos de produtos biotecnológicos.
- Cultivo submerso de *B. licheniformis* UCP-1014 produz proteases e biossurfactantes cujo líquido metabólico concentrado e formulado apresenta estabilidade da atividade proteolítica quanto ao tempo de armazenagem e ao aumento da temperatura.
- A ultrafiltração por membranas com porosidades diferentes pode aumentar a atividade enzimática do retentado.

3.2 SUGESTÕES

- A produção de proteases por *B. licheniformis* UCP-1014 precisa ser otimizada em biorreator em função da agitação mecânica e da aeração.
- Experimentos utilizando membranas de porosidades diferentes e formulações do produto final com o substrato devem ser realizadas, visando à obtenção de um produto com maior atividade enzimática e estabilidade.
- O desenvolvimento de tecnologia para produção de enzimas e biossurfactantes precisa ser incentivado nas diversas regiões do Brasil, considerando a dimensão territorial e o déficit da balança comercial brasileira.