

UNIVERSIDADE
CATÓLICA
DE PERNAMBUCO



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

João Caitano Alves Neto

**Produção de proteases por *Bacillus* sp. sob cultivo submerso na
presença de resíduos agroindustriais**

Recife

2012

João Caitano Alves Neto

Produção de proteases por *Bacillus* sp. sob cultivo submerso na presença de resíduos agroindustriais

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: Biotecnologia e Meio Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Alexandra Amorim Salgueiro

Recife

2012

**Produção de proteases por *Bacillus* sp. sob cultivo submerso na presença de
resíduos agroindustriais**

João Caitano Alves Neto

Examinadores:

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

Prof^a. Dr^a. Leonie Asfora Sarubbo
Universidade Católica de Pernambuco - UNICAP

Prof^a. Dr^a. Maria de Los Angeles Peres Palha
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Defendida em 4 de setembro de 2012

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

RESUMO

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes de carbono e de nitrogênio tem sido investigado na área de biotecnologia para produção de enzimas por micro-organismos. Dentre as enzimas microbianas importadas no Brasil, as proteases são aplicadas no processamento tecnológico de detergentes, fármacos, cosméticos, alimentos, dentre outros. O objetivo deste trabalho foi produzir proteases por cultivo submerso utilizando resíduos agroindustriais. A determinação da atividade proteolítica ocorreu na presença de azocaseína a 0,2 %. Cultivos submersos de culturas isoladas de *Bacillus* sp. foram realizados em frascos de Erlenmeyer. A atividade máxima de proteases foi determinada na presença de milhocina. A concentração do líquido metabólico com atividade proteolítica por ultrafiltração reteve cerca de 80 % da atividade inicial. Um planejamento experimental fatorial foi realizado para investigar a estabilidade do líquido metabólico. A maior atividade proteolítica média do líquido metabólico livre de células (196 U/mL) foi determinada na presença de sorbato de sódio a 0,5 %, cloreto de cálcio a 0,5 %, glicerol a 7,5 % e polietilenoglicol-200 a 0,5 %. O extrato enzimático formulado reteve 68 % da atividade proteolítica com 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente (28 °C). O retentado com atividade proteolítica apresentou pH ótimo 9 e 11 e retenção de 90 - 100 % da atividade durante 90 min em pH ótimo; a temperatura ótima foi 50 °C e a estabilidade térmica máxima a 40 °C durante 30 min a pH 11. A formulação de líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica que apresenta estabilidade térmica em pH alcalino é um bioproduto que pode ser utilizado como aditivo em detergentes.

Palavras-Chave: proteases, resíduos agroindustriais, *Bacillus* sp., cultivo submerso.

ABSTRACT

The reuse of agro-industrial waste as sources of carbon and nitrogen has been investigated in biotechnology for the production of enzymes by microorganisms. Among the microbial enzymes imported into Brazil, the proteases are applied in technological processes in the fields of detergents, pharmaceuticals, cosmetics, food, among others. The aim of this work was to produce proteases by submerged cultivation in the presence of agro-industrial waste. The determination of proteolytic activity was in the presence of 0.2 % azocasein. Submerged cultivation of *Bacillus* sp. strains isolated were carried out in Erlenmeyer flasks. The maximum protease activity was determined in the presence of corn steep liquor. The concentration of the liquid metabolic by ultrafiltration of the metabolic liquid with proteolytic activity retained 80% of the activity. A factorial experimental design was carried out to investigate the stability of the metabolic liquid. The maximum proteolytic activity of the liquid metabolic cell-free (196 U/mL) was determined in the presence of 0.5 % sodium sorbate, 0.5 % calcium chloride, and 7.5 % of glycerol and polyethyleneglycol-200. The enzyme extract formulated retained 68 % of the proteolytic activity after 10 days at storage at room temperature (28 °C). The retentate with proteolytic activity showed optimum pH 9 and 11 and retention 90 - 100 % of the activity for 90 min at optimum pH; the optimum temperature was 50 °C and the maximum thermal stability was at 40 °C for 30 min at pH 11. The formulation of metabolic liquid concentrate with proteolytic activity which has thermal stability at alkaline pH is a bioproduct which can be used as an additive in detergents.

Keywords: proteases, agroindustrial waste, *Bacillus* sp., submerged cultures.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura	Título	Pág.
Figura 1	Representação de ultrafiltração por membrana filtrante	25

CAPÍTULO 2

Figura 1	Atividades proteolíticas produzidas por <i>Bacillus</i> sp. na presença de resíduos orgânicos a 0,5 % dispersos em água após 24 h de cultivo submerso.....	45
Figura 2	Produção de proteases por <i>Bacillus</i> sp. nas proporções C/N iguais a 10/1 e 5/1, combinando dois resíduos orgânicos após 24 h de cultivo submerso	47
Figura 3	pH ótimo de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração em tampão tris-HCl 0,1 M com atividade proteolítica produzida por <i>Bacillus</i> sp.	49
Figura 4	Estabilidade ao pH de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração em tampão tris-HCl 0,1 M com atividade proteolítica produzida por <i>Bacillus</i> sp.....	49
Figura 5	Estabilidade térmica em pH 11 de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração com atividade proteolítica produzida por <i>Bacillus</i> sp.....	50
Figura 6	Estabilidade térmica em pH 11 de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração com atividade proteolítica produzida por <i>Bacillus</i> sp.....	51
Figura 7	Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise dos fatores dos ensaios, em resposta a estabilidade da atividade proteolítica do produto formulado com 30 dias de armazenamento a 28 ° C.....	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela	Título	Pág.
Tabela 1	Aplicações de proteases microbianas	17
Tabela 2	Características de proteases	18
Tabela 3	Composição típica de milhocina	20
Tabela 4	Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar ...	20
Tabela 5	Composição química da folha de macaxeira	21
Tabela 6	Características de proteases produzidas por <i>Bacillus</i> em resíduo industrial	23

CAPÍTULO 2

Tabela	Título	Pág.
Tabela 1	Fatores e níveis de planejamento fatorial 2 ³ para formulação de líquido metabólico com atividade proteolítica	39
Tabela 2	Caracterização físico-química de resíduos agroindustriais.....	41
Tabela 3	Atividades proteolíticas e pH em caldo nutritivo de amostras <i>Bacillus</i> sp. isoladas.....	43
Tabela 4	Atividades proteolíticas de amostra de <i>Bacillus</i> sp. XI em caldo nutritivo na presença de resíduos agroindustriais.....	43
Tabela 5	Atividades proteolíticas e retenção da atividade do retentado na presença de aditivos com 0, 10, 20 e 30 dias de armazenagem a 28 °C.....	53

SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO	10
1.2 OBJETIVOS.....	12
1.2.1 Objetivo geral.....	12
1.2.2 Objetivos específicos	12
1.3 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
1.3.1 Micro-organismos.....	13
1.3.2 Enzimas	14
1.3.3 Cinética enzimática.....	15
1.3.4 Proteases	16
1.3.5 Resíduos agroindustriais	19
1.3.6 Processo de produção de enzimas.....	21
1.3.7 Ultrafiltração.....	24
1.3.8 Estabilização de líquido metabólico com atividade proteolítica para aplicação industrial	26
1.4 REFERÊNCIAS	28

CAPÍTULO 2

Estabilização e produção de proteases por <i>Bacillus sp.</i> na presença de milhocina sob cultivo submerso.....	32
2.1 INTRODUÇÃO.....	33

2.2 MATERIAL E MÉTODOS	35
2.2.1 Micro-organismo	35
2.2.2 Caracterização de resíduos agroindustriais	35
2.2.3 Padronização do inóculo.....	37
2.2.4 Condições de cultivo submerso	37
2.2.5 Determinação de atividade proteolítica	37
2.2.6 Ultrafiltração	38
2.2.7 Caracterização do extrato proteolítico.....	38
2.2.8 Formulação de líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica	39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
2.3.1 Caracterização de resíduos agroindustriais	40
2.3.2 Seleção de amostras de <i>Bacillus sp.</i> produtoras de proteases.....	42
2.3.3 Investigação de resíduos industriais para produção de proteases por <i>Bacillus sp.</i>	42
2.3.4 Investigação da relação C/N para produção de proteases por <i>Bacillus</i> <i>sp.</i>	45
2.3.5 Produção de proteases por <i>Bacillus sp.</i> sob cultivo submerso na presença de milhocina	47
2.3.6 Concentração de líquido metabólico livre de células com atividade proteolítica produzida por <i>Bacillus sp.</i>	47
2.3.7 pH ótimo e estabilidade ao pH do retentado de proteases produzidas por <i>Bacillus sp.</i>	48
2.3.8 Temperatura ótima e estabilidade térmica do retentado de proteases produzidas por <i>Bacillus sp.</i>	50
2.3.9 Planejamento fatorial 2 ³ para formulação do retentado do líquido metabólico contendo atividade proteolítica	52
2.4 CONCLUSÕES.....	55
2.5 REFERÊNCIAS	56

CAPÍTULO 3

3.1 CONCLUSÕES GERAIS	59
3.2 SUGESTÕES	59

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia atua em diversos setores industriais por meio de técnicas inovadoras para produção de bioprodutos e serviços; na área de saúde, pela evolução no tratamento de doenças com uso de novos medicamentos; no desenvolvimento e melhoria da produção de alimentos, na preservação do meio ambiente pela utilização sustentável da biodiversidade com multiplicação e reprodução de espécies vegetais, animais e microbianas, além da recuperação e tratamento de resíduos e efluentes (BON et al., 2008).

Os micro-organismos são responsáveis por grande parte dos produtos biotecnológicos comercializáveis por possuírem baixo tempo de duplicação, facilidades de cultivo e de manipulação genética. Esses organismos consomem substratos, durante os processos de crescimento e de reprodução com produção de material celular e substâncias de elevado valor econômico. Dentre os produtos sintetizados pelos micro-organismos, as enzimas apresentam elevado potencial de aplicação biotecnológica em diversas áreas (OLIVEIRA et al., 2007).

Estudos realizados em 2005 mostraram que a balança comercial brasileira apresenta saldo negativo de 72 % em relação ao mercado internacional 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).

As proteases microbianas constituem um dos mais importantes grupos de enzimas de aplicação industrial, suprimindo quase 60 % do mercado de enzima mundial. As aplicações dessas enzimas abrangem formulações de detergentes, produção de alimentos e bebidas, processamento de couro e pele, amaciamento de carnes, dentre outros (DELATORRE et al., 2009). A literatura mostra que uma proporção grande de proteases comercialmente disponível é derivada do cultivo de *Bacillus* (GUPTA et al., 2002; FELIX, NORONHA, MARCO, 2004).

Segundo Bon et al. (2008), o Brasil possui uma 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 de tecnologias para a produção de enzimas em larga escala, responde às demandas de caráter tecnológico, mercadológico e de preservação ambiental. Considerando que, aproximadamente 30 a 40 % do custo envolvido na produção de metabólitos microbianos estão relacionados aos nutrientes empregados para o crescimento dos micro-organismos, a produção de proteases deve ser investigada, utilizando-se resíduos agroindustriais nos meios de cultura.

Considerando o potencial dos micro-organismos para obtenção de produtos de valor agregado, associado à produção de enzimas a partir de matéria-prima de baixo custo, buscou-se nesse trabalho, produzir proteases reaproveitando resíduos agroindustriais.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Produzir proteases por *Bacillus sp.* sob cultivo submerso, reaproveitando resíduos agro-industriais.

1.2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição físico-química de resíduos agroindustriais;
- determinar atividade proteolítica;
- selecionar cultura de *Bacillus sp.* produtora de proteases;
- selecionar fontes de carbono e de nitrogênio para produção de proteases a partir de resíduos;
- investigar a relação carbono/nitrogênio na produção de proteases;
- produzir proteases sob cultivo submerso por *Bacillus sp.*;
- avaliar o processo de separação de proteases por membrana filtrante;
- avaliar os efeitos de pH e de temperatura na estabilidade da atividade proteolítica do líquido metabólico livre de células;
- investigar a estabilidade do líquido metabólico com atividade proteolítica para aplicação industrial por planejamento fatorial;
- investigar a vida útil do produto enzimático formulado.

1.3 REVISÃO DE LITERATURA

1.3.1 Micro-organismos

A utilização de micro-organismos para produção de enzimas apresenta várias vantagens nos processos biotecnológicos: não há flutuações sazonais devido a condições climáticas adversas; produção de amplo espectro de enzimas de diferentes características com relação a pH e resistência a elevadas temperaturas; fácil manipulação fisiológica; além da otimização de seleção de mutantes, de indução e de transferência de genes, além de condições de crescimento microbiano pela engenharia genética (SMITH, 2004).

O gênero *Bacillus* (família *Bacillaceae*) é heterogêneo conforme estudos genéticos do ácido ribonucleico ribossômico (ARNr 16S e 23S). Em nível genotípico, as espécies apresentam diferentes metabolismos de açúcares e composição da parede celular variável. As condições fisiológicas do cultivo de espécies de *Bacillus* são adversas quanto à temperatura, pH, salinidade, degradação de açúcares. Essas bactérias são quimiorganotróficas com metabolismo respiratório e fermentativo (PELCZAR et al., 1996).

O gênero *Bacillus* apresenta 217 espécies e 4 subespécies (EUZEBY, 2011). Essas bactérias estão amplamente distribuídas no ar, na água e principalmente no solo onde desempenham um papel importante no ciclo do carbono e do nitrogênio; são saprófitas e poucas espécies são patogênicas para os seres vivos, sendo a espécie mais patogênica, o *Bacillus anthracis*, agente etiológico do carbúnculo hemático em animais e homem. Essa espécie foi utilizada como arma biológica cujo último caso foi relatado em 2001, logo após o ataque terrorista de 11 de setembro, em que foram disseminados esporos dessa bactéria, por meio do sistema postal americano (TRIVEDI, 2010).

O *Bacillus thuringiensis* sintetiza toxinas letais para insetos sendo produzido em grande escala e comercializado no Nordeste em regiões cujo controle biológico tem sido implementado. *Bacillus subtilis* produz antibióticos e enzimas como proteases, termolisinas, subtilisinas; essas bactérias também são produtoras de bacteriocinas que são agentes antimicrobianos naturais aplicados na conservação

de alimentos. *Bacillus licheniformis* são produtores de proteases e de bacteriocina com potencial aplicação na área veterinária. *Bacillus amyloliquefaciens* é um produtor de *enzimas* (amilases, proteases), além de antifúngicos e antibacterianos; tem sido aplicado no controle de fitopatógeno, aumentando o rendimento da produção de soja (SCHULZ et al., 2005).

1.3.2 Enzimas

Enzimas são macromoléculas predominantemente protéicas, imprescindíveis a qualquer ser vivo, pois aceleram as reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. A partir do século XX, elas passaram a ser extraídas de células microbianas e a ocuparem também papel importante em produtos e processos industriais por acelerar reações sob condições amenas de pressão e temperatura (SAID, PIETRO, 2004). Como catalisadores, as enzimas atuam em pequenas quantidades e são recuperadas no final do processo; não realizam reações energeticamente desfavoráveis, não modificam o sentido dos equilíbrios químicos, mas aceleram sua realização (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005).

A atividade enzimática envolve a medida da velocidade de reação. Essa atividade depende da estrutura da proteína, isto é, do número de cadeias peptídicas e arranjo dessas cadeias na molécula, da natureza do substrato e do grupo prostético, dentre outros fatores (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 2005). Existe uma correlação entre a estrutura das proteínas ou peptídeos que fazem parte da molécula enzimática e suas propriedades biológicas, resultando em especificidades extraordinariamente elevadas e reproduzíveis. Segundo a *Enzyme Commission*, “uma unidade (U) de atividade é a quantidade enzima que catalisa a transformação de 1 μmol de substrato ou a formação de 1 μmol de produto por minuto”, nas estabelecidas condições do ensaio (temperatura, pH, concentração de substrato). A atividade específica é expressa em termos de atividade por miligrama de proteína (U/mg). A atividade enzimática pode ser medida em condições tais que permita que a velocidade de reação seja máxima, o que significa que o substrato [S] deve estar em concentração elevada, de modo a permitir que toda enzima [E] esteja complexada ao substrato [ES]. Nesse caso a velocidade [v] da reação, proporcional

à concentração enzimática, será também proporcional ao complexo ES; sendo expressa pela equação: $v = k [E] = k [ES]$ (PINTO, 2009).

O modelo alostérico explica quantitativamente como a atividade de certas enzimas pode ser regulada pela ligação de pequenas moléculas e isto serviu de base para entender muitas características de controle de enzimas na célula. Uma importante característica do modelo alostérico é a ligação de estruturas às enzimas, induzindo mudanças estruturais (VOET, 2008).

Um conjunto intermediário de enzimas apresenta especificidade de grupo, como as hexoquinases, que catalisam a fosforilação de uma variedade de açúcares contanto que sejam aldohexoses. A especificidade absoluta é o tipo de especificidade exclusiva, isto é, quando uma enzima atua somente sobre um determinado composto, como a *urease* que hidrolisa a uréia, mas nenhum de seus derivados, ou a tripsina, que hidrolisa apenas ligações peptídicas formadas por grupos carboxílicos dos aminoácidos básicos. Outro aspecto importante da especificidade das enzimas é a sua estereoespecificidade com relação ao substrato. Uma enzima pode ter uma especificidade ótica em relação aos isômeros D e L dos aminoácidos. A maioria das enzimas hidrolisa apenas ligações peptídicas de L-aminoácidos, o que deveria ser esperado, já que as proteínas enzimáticas são constituídas por L-aminoácidos e têm conformações determinadas (VOET, 2008).

Na classificação das enzimas, as hidrolases catalisam reações na presença da água, estando entre elas, as enzimas proteolíticas e amilolíticas.

1.3.3 Cinética enzimática

A análise quantitativa do efeito de cada um dos fatores que influencia a atividade enzimática avaliada através do aumento ou redução da velocidade da reação catalisada é estudada como cinética enzimática. Ela depende da concentração da enzima, concentração de cofatores, concentração e tipo de inibidores (quando presentes) e ainda pH, temperatura e força iônica (MARANGONI, 2003)

Sob determinadas condições, a velocidade de transferência do substrato em produto é proporcional à quantidade de enzima. Desvios da linearidade podem ocorrer devido à presença de inibidores na própria solução de enzima, presença de

substâncias tóxicas, presença de um ativador que dissocia a enzima e limitações impostas pelo método de análise. A fim de se evitar o efeito causado por esses fatores, recomenda-se utilizar nos ensaios cinéticos enzimas com elevado grau de pureza, substratos puros e método de análise confiável (GIONGO, 2006).

Geralmente, as enzimas são ativas numa faixa restrita de pH e na maioria dos casos há um pH ótimo definido. O efeito do pH sobre a afinidade pode ser alterado, utilizando-se elevadas concentrações de substrato de modo a se saturar a enzima em todos os valores de pH. O efeito do pH sobre a enzima deve-se às variações no estado de ionização dos componentes do sistema à medida que o pH varia. Como as enzimas são proteínas contém muitos grupos ionizáveis e existem em diferentes estados de ionização; por isso, a atividade catalítica é restrita a uma pequena faixa de pH (HARTMEIER et al., 2005). A atividade da enzima deve ser então medida no pH ótimo. A estabilidade de uma enzima ao pH depende de muitos fatores como temperatura, força iônica, natureza química do tampão, concentração de vários preservativos (por exemplo, glicerol, compostos sulfídricos), concentração de íons metálicos contaminantes, concentração de substratos ou cofatores da enzima e concentração da enzima (REGINATO, TEIXEIRA, 2009).

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior à medida que a temperatura aumenta. Por serem as enzimas proteínas, a atividade desses biocatalisadores é altamente dependente da temperatura. O efeito da temperatura de uma enzima depende de um número de fatores que incluem o pH, a força iônica do meio e a presença ou ausência de ligantes. Os substratos frequentemente protegem a enzima da desnaturação pelo calor. No processo de desnaturação térmica ocorre a perda da atividade biológica da enzima. Toda enzima tem uma temperatura ótima, ou seja, é a temperatura máxima na qual a enzima apresenta a maior atividade por um período de tempo (GIONGO, 2006).

1.3.4 Proteases

As proteases ou enzimas proteolíticas catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas. Essas enzimas podem ser classificadas em exopeptidases, quando catalisam reações de hidrólise das proteínas nas

extremidades das cadeias protéicas, ou em endopeptidases, quando catalisam reações de hidrólise das ligações peptídicas internas às moléculas de proteínas.

Na classificação das proteases em função das características químicas do centro ativo dessas enzimas, as proteases são denominadas de:

- serina protease – presença de serina;
- SH protease - contem grupo sulfidrila;
- metalo protease - contem metais (Mg, Zn, Co, Fe, Cu, Ni, Cd);
- protease ácida - em geral, o centro ativo possui grupo carboxila e o pH ótimo de atividade é em torno de 2 a 5 (CARVALHO, 2007).

A maioria das enzimas usadas em escala industrial é extracelular, para as quais as técnicas de separação nos meios de cultivos são simples, embora se encontrem sob forma muito diluída.

A tabela 1 ilustra aplicações de proteases produzidas por vegetais, animais e micro-organismos.

Tabela 1 Aplicações de proteases microbianas

Aplicações	Proteases
Panificação, massas e biscoitos - modificação da viscosidade e da textura da massa	Papaína, bromelina
Cerveja - estabilidade ao frio	Pepsina gástrica, papaína
Limpeza - remoção de manchas	Bactérias, fungos, pâncreas
Peles e couros - remoção da elastina	Bactérias, fungos, pâncreas
Carnes – amaciamento	Papaína, bromelina
Queijos - formação de coalhada e flavorizante	Renina, fungos
Alimentos protéicos - obtenção de hidrolisados	Bactérias, pâncreas

Fonte: Adaptada do NOVOZYMES (2010)

Quase um terço das enzimas conhecidas requerem um componente não protéico para sua atividade, denominado de cofator; no caso das proteases, íons cálcio (Ca^{+2}) são requeridos como cofator.

As características das enzimas com relação a pH variam bastante; valores de pH ótimos e estabilidade de proteases aplicadas em alimentos estão ilustrados na tabela 2. Enquanto as proteases de origem vegetal (bromelina, papaína) apresentam pH ótimo 7 – 8, a pepsina de origem animal tem pH ótimo 2,0. Por outro lado, proteases bacterianas produzidas por *Bacillus subtilis* tem pH ótimo em meio básico, na faixa de 7 a 11.

Do ponto de vista tecnológico, as endopeptidases são as mais utilizadas nos processamentos de alimentos, e em alguns casos sua ação é complementada com exopeptidases. As serinas protease têm máximo de atividade em pH alcalino, a cisteínaprotease geralmente apresenta máxima atividade em pH próximo do neutro, e a aspártico protease tem uma atividade catalítica máxima a pH ácido. As metalo proteases contêm um metal essencial, usualmente zinco, e têm ótima atividade em pH próximo do neutro. Íons de cálcio estabilizam estas enzimas, e agentes quelantes, como EDTA, as inibem (NOVOZYMES, 2010).

A tabela 2 apresenta as fontes produtoras de enzimas o pH ótimo para a atividade enzimática e também a estabilidade ao pH.

Tabela 2 Características de proteases

Nome	Procedência	pH ótimo	Estabilidade ao pH
<u>Proteases animais</u>			
Protease pancreática	Pâncreas	9,0	3 – 5
Pepsina	Mucosa estomacal	2,0	55 - 6,0
<u>Proteases fúngicas</u>			
Protease neutra	<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5 - 7,5	7
Protease alcalina	<i>Aspergillus oryzae</i>	6 - 9,5	7 – 8
Protease	<i>Mucor pusillus</i>	3,5 - 4,5	3 – 6
<u>Proteases bacterianas</u>			
Protease alcalina lisina	<i>Bacillus subtilis</i>	7 – 11	7,5
Lisinaprotease neutra	<i>Bacillus termoproteolyticus</i>	6 – 9	6 – 8

Fonte: Adaptada do NOVOZYMES (2010).

1.3.5 Resíduos industriais

O reaproveitamento de resíduos agroindustriais como fontes de carbono e de nitrogênio, além de fornecer sais minerais tem sido frequentemente investigados em pesquisas científicas na área de biotecnologia onde micro-organismos são manipulados em processos tecnológicos na presença de potenciais substratos de baixos custos para produção de enzimas.

Na fabricação de queijos, aproximadamente, 80 % do volume de leite processado corresponde a soro de leite, também denominado de soro de queijo. No Brasil, são produzidos cerca de 1.000.000 t/ano de soro de leite cujo reaproveitamento deve ser incentivado para diminuir o lançamento em recursos hídricos que contribui para o aumento da poluição ambiental (1998, apud FERREIRA, MOSQUIM; LADEIRA et al., 2010).

A água de maceração de milho, denominada de milhocina, provém principalmente da fabricação de óleo de milho e constitui uma fonte rica de carboidratos, peptídeos, aminoácidos, minerais, vitaminas, dentre outros nutrientes (LADEIRA et al., 2010). A composição desse resíduo é variável, dependendo da origem da matéria-prima e de seu processamento. Uma composição típica de milhocina está apresentada na tabela 3. Dentre os compostos, encontram-se as proteínas em elevada concentração (41 %), sendo esse resíduo, por conseguinte, uma excelente fonte de nitrogênio, além de fontes de carbono (ácido lático e açúcares), atingindo 29 % (1999, apud AKHTAR; NASCIMENTO, MARTINS, 2006).

O melaço é um subproduto da indústria sucro-alcooleira a partir da cana-de-açúcar (tabela 4). É rico em carboidratos (49 %) embora apresente um pequeno percentual de nitrogênio (0,58 %). Consequentemente, é necessário que se adicione fonte de nitrogênio no reaproveitamento desse subproduto em meios de cultivo de micro-organismos. O conteúdo de sais minerais, cerca de 10 %, é outro constituinte químico que favorece o crescimento microbiano; os metais presentes podem atuar como cofatores de enzimas (DELATORRE et al., 2009).

Tabela 3 Composição típica de milhocina

Caracterização	Valor
Umidade	49,0 %
pH	3,9
Proteína	40,8 %(p/p)
Ácido láctico	16,0 %(p/p)
Açúcares redutores	12,8 %(p/p)
Outros componentes	30,4 %(p/p)

Fonte: Adaptada de Akhtar et al. (1998).

Tabela 4 Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar

Componentes	Concentração (%)
Glicídios redutores em glicose	14,72
Glicídios não redutores em sacarose	33,78
Nitrogênio	0,58
Fósforo	0,015
Potássio	1,63
Umidade	9,10
Cinzas	9,98

Fonte: Dalatorre et al. (2009)

O pó da folha de macaxeira se constitui em uma excelente fonte protéica, além de apresentar vitaminas A, C e do complexo B, ferro e cálcio. Apesar do seu potencial como fonte protéica, as folhas de macaxeira apresentam compostos cianogênicos que podem inviabilizar o consumo, tanto na alimentação humana quanto animal. Em relação ao conteúdo de minerais analisados por 100 g (tabela 5), a folha apresentou teores baixos de cálcio, ferro e zinco (BARBOSA, 2006). A

composição química da parte aérea da folha de macaxeira fresca, desidratada ao sol e ensilada está descrita na tabela 5.

Tabela 5 Composição química da folha de macaxeira

<u>Componentes</u>	<u>Fresca</u>	<u>Desidratada</u>	<u>Ensilada</u>
Matéria Seca	25,95	89,00	31,99
Proteína Bruta	14,99	10,84	11,50
Fibra detergente	em 42,53	49,81	48,85
Gordura	2,66	2,44	2,96
Cálcio	1,34	1,12	1,21
Fósforo	0,21	0,17	0,14

Fonte: Carvalho (1983)

1.3.6 Processo de produção de enzimas

Processos microbianos industriais podem utilizar meios de composição química definidos os quais, não são comercialmente econômicos em se tratando de produção de produtos visando uma escala industrial. Os meios de composição complexa, utilizados na maior parte dos processos, empregam matérias-primas industriais, provenientes principalmente do setor agrícola (BON et al., 2008).

Os processos microbianos de produção de enzimas ocorrem basicamente em cultivo submerso quando as células produtoras se desenvolvem em meio de cultivo líquido. Nos cultivos microbianos, a adição de resíduos industriais, por ser de origem complexa, pode modificar a fisiologia do micro-organismo, isto é, o comportamento do micro-organismo. Em função disso, o cultivo em meio líquido pode apresentar turvação, crescimento em películas (ou biofilme) ou em depósitos, dentre outros (PELCZAR, CHAN, KRIEG, 1996).

Os biofilmes são definidos como comunidades de micro-organismos imobilizados conjuntamente numa matriz de substâncias poliméricas extracelulares

de origem microbiana. As vantagens de uma célula bacteriana de se encontrar contida num biofilme são relacionadas à proteção contra agentes agressivos. A maioria das características atribuídas ao crescimento microbiano em biofilmes pode ser explicada por fenômenos de transferência de massa. Nos biofilmes, agregados microbianos são ambientes densamente empacotados onde o fluxo de líquido é limitado o qual interfere negativamente durante o cultivo microbiano com relação à assimilação de nutrientes. Por conseguinte, a produção de enzimas pode ser limitada quando há formação de biofilmes. Por outro lado, em culturas de células livres, o transporte de solutos do meio líquido (normalmente bem homogeneizado) para uma célula, ou vice-versa, é um processo relativamente rápido, não constituindo um passo limitante na totalidade dos bioprocessos que ocorrem na célula (XAVIER et al., 2006).

Em escala industrial, exoenzimas como as proteases alcalinas, são produzidas em meios de cultura complexos, contendo resíduos industriais e outros substratos. No entanto, sua otimização é de grande importância para viabilizar o desenvolvimento de tecnologia em países importadores (LADEIRA et al., 2010). O uso de substratos de baixo custo, como resíduos agroindustriais, tem sido uma alternativa para reduzir os custos de produção.

A tabela 6 apresenta de forma esquematizada, micro-organismos produtores de proteases utilizando resíduos, características e atividades das proteases com as respectivas referências dos trabalhos publicados.

Segundo Delatorre et al. (2009) e Nascimento e Silva (2007), os *Bacillus* de modo geral produzem maior quantidade de proteases ao final da fase exponencial de crescimento. Uma vez que a síntese de proteases está relacionada com elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação, fatores que afetam a esporulação, como condições de estresse causadas pela redução da concentração de nutrientes, tensão de oxigênio ou composição do meio, podem ter grande efeito na produção dessas enzimas. Os resultados obtidos por Liu et al. (2010), evidenciaram que após 72 h de cultivo, foi produzido 1,2 U/mL de próteses na presença de farinha de soja e glicerol.

Segundo Delatorre et al. (2009), o aumento da concentração de melaço de cana-de-açúcar até 0,3 % favoreceu o crescimento do *Bacillus* sp. (SMIA-2), assim como a produção de proteases. Entretanto, o meio que proporcionou a obtenção de maiores níveis de atividade da enzima apresentou 0,1 % (v/v) de proteínas do soro de leite, 0,2 % (v/v) de água de maceração de milho e 0,5 % do melaço.

Tabela 6 Características de proteases produzidas por *Bacillus* em resíduo industrial

Micro-organismo	Resíduo	T (°C)	pH	Atividade máxima	Fonte
<i>Bacillus</i>	Amido de milho e farelo de soja	37	7,0	1350 U/mL	RAMNANI et al., 2005
<i>Bacillus</i> sp.	Farelo de arroz	50	9	34 U/mL	NAIDU, 2005
<i>Bacillus subtilis</i>	Torta de soja e torta de babaçu	37	7,4	12 U/mL	SOARES et al., 2005
<i>Bacillus</i> sp.	Soro de leite e água de maceração de milho	70	7,5	70 U/mg	NASCIMENTO, 2006
<i>Bacillus</i> sp. (SMIA-2)	Água de maceração e soro de leite	50	7,5	59,2 U/mg	NASCIMENTO, 2007
<i>Bacillus licheniformis</i>	Peptona, extrato de carne e extrato de levedura	37	7,5	102 U/mg	POTUMARTH, 2009
<i>Botrytis cinérea</i>	Glicose, amido de milho, arroz, batata e lactose	28	6,5	1017 U/mL	ABIDI, 2009
<i>Bacillus</i> sp. (SMIA-2)	Melaço, soro de leite e água de maceração de milho	50	7,5	27,8 U/mg	DELATORRE et al., 2009
<i>Bacillus</i> sp. (SMIA-2)	Pectina de maçã, soro de queijo e milhocina	50	7,5	55 U/mg	LADEIRA et al., 2010
<i>Streptomyces</i>	Farinha de soja e glicerol	28	7,0	1,2 U/mL	LIU et al., 2010

Meios de cultura com elevado percentual de proteínas, como o soro de leite, possuem indutores para produção de proteases. A utilização de proteases em formulações de detergentes requer que essas enzimas possuam elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, que sejam efetivas em baixas quantidades (0,4 - 0,8 %) e compatíveis com vários detergentes comerciais (NASCIMENTO, MARTINS, 2006).

A utilização da glicina juntamente com íons cálcio resultou em aumento da estabilidade enzimática (NASCIMENTO, 2006). O íon cálcio possui importante efeito estabilizador de proteases, enquanto o fosfato de potássio quando tem sua

concentração reduzida aumenta a atividade da protease (NASCIMENTO, SILVA, 2007).

Segundo a literatura, para o crescimento de qualquer micro-organismo, o substrato deve atender às suas necessidades nutricionais e energéticas (carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio). Por exemplo, um meio contendo o melaço de cana-de-açúcar deve ser enriquecido com sais de amônio (nitrogênio inorgânico) ou com extrato de levedura (hidrolisado protéico), considerando o pequeno percentual de fonte de nitrogênio que esse resíduo apresenta (tabela 4).

1.3.7 Ultrafiltração

Os processos de filtração tangencial por membranas têm sido utilizados na biotecnologia. A ultrafiltração é um dos processos, em que a força diretriz é a diferença de pressão através da membrana. É um método de concentração bastante utilizado com finalidade de recuperar, além de concentrar gorduras, emulsões, colóides e proteínas, que são utilizadas como aditivos em diversos produtos industriais. Essa técnica aplicada na produção de enzimas produz um concentrado protéico que favorece a estabilidade da atividade, além do transporte e acondicionamento do bioproduto, o que viabiliza a sua utilização por diminuir os custos com frete e facilitar o manuseio (PEPPIN, ELLIOT, 2001; FRANCO, 2006).

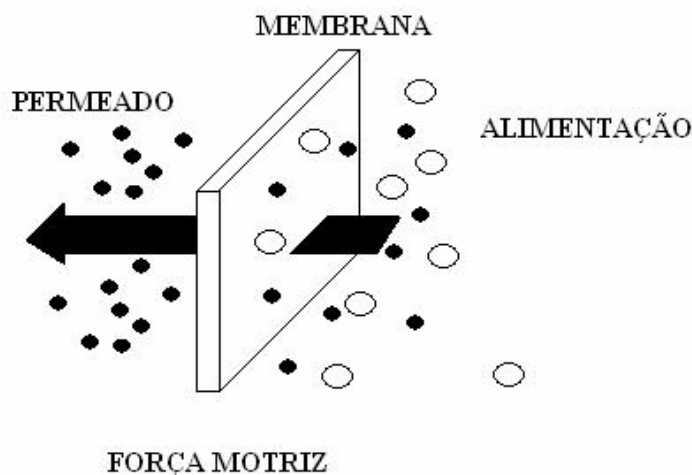
Na ultrafiltração, o fluxo de entrada é separado em dois fluxos de saída, conhecidas como permeado e retentado. O permeado é a fração que atravessa a membrana semi-permeável e o retentado é a fração enriquecida com os solutos ou sólidos suspensos que não atravessam a membrana. A figura 4 ilustra a técnica de ultrafiltração visando concentrar proteínas contidas num meio líquido (FRANCO, 2006).

As membranas de ultrafiltração são classificadas pela massa molar de corte (MMC). A MMC de uma membrana de ultrafiltração é definida como a massa molar para a qual 90% dos solutos com massa molar igual são retidos pela membrana. A ultrafiltração abrange uma faixa de 1 a 100 kDa de MMC (FERNANDEZ, 2009).

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).

Figura 1 Representação de ultrafiltração por membrana filtrante



Fonte: 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, 2003).

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 apresentavam diferentes tamanhos de poros, constituídas de

fluoreto de polivinilideno 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 %).

1.3.8 Estabilização de líquido metabólico com atividade proteolítica para aplicação industrial

Diversas técnicas são utilizadas visando à estabilização de um produto enzimático. A ultrafiltração por membrana, concentrando o produto final com atividade catalítica estabiliza a conformação da proteína. Outras estratégias são também utilizadas: procura de enzimas com alta estabilidade natural, melhoramento genético de micro-organismos produtores de enzimas, adição de agentes estabilizadores (formulação), modificação química, além de encapsulamento em géis, fibras e micélios (BUXBAUM, 2011).

A formulação de produtos biotecnológicos líquidos é mais complexa do que a dos produtos sólidos porque os compostos interagem entre si. Para estabilizar metabólicos líquidos obtidos de cultivos microbianos, inúmeros fatores interferem na formulação devido à presença de várias enzimas (ILLANES, 2008).

A formulação de enzimas inclui várias etapas: eliminação de substâncias e ou organismos indesejáveis, estabilização e normatização. A primeira etapa envolve ajuste de pH, eliminação de endotoxinas, ácidos nucleicos, além de organismos que podem contaminar o produto final, interferindo na “performance” da enzima. O extrato enzimático pode ser formulado no estado líquido concentrado e ou purificado e no estado sólido que tem várias vantagens no manuseio, transporte por manter a vida útil maior do produto final. Por outro lado, a preparação líquida apresenta custos menores por evitar a etapa de secagem (ILLANES, 2008).

O teor de água presente no produto formulado influencia na estabilidade de enzimas. A concentração de líquidos metabólicos por ultrafiltração favorece a estabilidade da atividade enzimática (NOVOZYMES, 2002).

A literatura recomenda a utilização de conservantes como formol e sorbato de sódio para inibir de crescimento do micro-organismo durante o armazenamento à temperatura ambiente. A adição de substância como glicerol, sorbitol e

polietilenoglicol, além dos substratos das enzimas ao líquido metabólico livre de células concentrado, aumentam as atividades enzimáticas (ILLANES, 2008).

Na formulação de biodetergentes a serem comercializados recomenda-se a adição de proteases e o inibidor correspondente e no final, acrescentar as outras enzimas (lipases, amilases), evitando a ação proteolítica sob as mesmas. Ressalta-se a adição de Ca^{+2} como indutor das proteases para aumentar a atividade proteolítica (LUZ, 2007).

A estabilização das enzimas na presença do substrato ocorre através de interações entre o grupo carboxila e grupo amino da proteína. A temperatura, pH e agentes desnaturantes interferem na estabilidade da molécula ou na sua função biológica (BUXBAUM, 2011)

A reversibilidade na desnaturação de enzimas pode ocorrer pela remoção de agentes ou pelas mudanças em condições de conservação (FERNANDEZ, 2009). Iyer (2008) formulou proteases na presença de 40 % de glicerol cujo produto reteve 100 % de atividade proteolítica após 23 dias de incubação a 33 °C.

1.4 REFERÊNCIAS

ABIDI, F.; LIMA, M. F.; NEJIB, M. M. Production of alkaline proteases by botrytis cinerea using economic raw materials: assays biodetergent. **Process Biochemistry**. v. 43, p. 202-208, 2008.

BARBOSA, C. O.; LOPES, I. B. M.; MORANGO, M. A.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO R. S. R. Conteúdo de minerais dos ingredientes e da multimistura, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, p. _-_, 2006.

BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 22. ed., São Paulo: Melhoramentos, 1982, 1062 p.

BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 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.

BUXBAUM, E. **Biophysical chemistry of proteins**. New York: Springer, 2011.

CARVALHO, H. A. S. Análise Bioquímica e Molecular de Proteases na Interação *Theobroma cacao – Moniliphthora pernicioso*. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, 2007.

DELATORRE, A. B.; ANDRADE M. V. V.; LADEIRA S. A.; PEREZ V. H.; MARTINS M. L. L.. Utilization of agroindustrial residues for sp SMIA-2. **Ciência e Cultura: Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**. v. 4, p. 41-46, 2009.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus Bacillus. Disponível em: <<http://www.bacterio.cict.fr/b/bacillus.html>> Acesso em: 20 nov. 2011.

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

FERNÁNDEZ, D. E. R., Desenvolvimento de um bioprocesso por fermentação e em estado sólido para produzir e recuperar enzimas de interesse comercial. Tese (pós-graduação em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

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 Cristóvão, 2006.

GIONGO, J. L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* 2006, 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

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

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NÓBREGA, R. **Processos de separação por membranas**. Rio de Janeiro, e-book, 2006. 180p.

HARTMEIER, W.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; DOUMÈCHE, B.; BÜCHS, J. Controlling pH during lipase-catalysed esterification in aqueous-organic two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**. Vol, pag, 2005.

ILLANES, A. **Enzymes biocatalisis - principles and applications**, Valparaíso: Springer, 2008.

IYER, P. A.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**. v. 43, p. 1019-1032, 2008.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LADEIRA, S. A. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**. v. 33, p. 324-325, 2010.

LIU, P. S. L., NASCIMENTO, T. P., PORTO, T. S., PORTO, A. L. F. Produção de proteases por *Streptomyces sp* DPUA1566 utilizando planejamento fatorial. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010 – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro, 2010.

LUZ, F. F. Desenvolvimento de um detergente enzimático para limpeza de ordenhadeiras e avaliação de sua viabilidade econômica de produção. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) 2007.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics**, John Wiley Sons, New Jersey 2003.

NAIDU, K. S. B.; DEVI, K. L Optimization of thermostable alkaline rotease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal Biotechnology**, vol4, p.724-726, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. **Ciência e tecnologia de alimentos**, vol 27 (2), Campinas: 2007

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus Sp* Smia-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 (3), p. 582 – 588, 2006.

NOVOZYMES. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acesso em:10 de março de 2012

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**, v. 27, p. 61-66, 2007.

PINTO, G. F.; .MENEZES, R. R. **Cinética enzimática**. Rio de Janeiro: e-papers , 2009.. 320p

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1996. v. 2, 517p.

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., JETTY, A. Alkaline protease production by submerged fermentation in stirred tank reactor using *bacillus licheniformis* ncim-2042; effect of aeration and agitation regimes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 185-192, 2007.

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

REGINATO, E.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.81-86, 2009

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R., Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004.

SCHULZ, D., BONELLI, R. R., BATISTA, C. R. V. Bacteriocinas e enzimas produzidas por *bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentação e Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 403-411, 2005.

SMITH, J. E. **Biotechnology: Studies in Biology**, 4^a ed., New York: Cambridge University Press, 2004.

SOARES, V.F., CASTILHO, L. R., BON, E. P. S., FREIRE, D. M. G. Análise comparativa da produção de protease por *Bacillus subtilis* por fermentação submersa e no estado sólido. In: **XIV Simpósio Nacional de Fermentações (SINAFERM)**, 2003, Florianópolis. 2003. p. 1-6.

TRIVEDI P.C. PANDEY S. BHADAURIA S. **Text book of microbiology**. Aavishkar Publishers: Índia. 2010.

VOET,D.; VOET, J.G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica**, 2^a ed., 1264p. Artmed Porto Alegre. 2008

XAVIER, J. B.; Picioreanu C., Almeida J. S., van Loosdrecht .M. C. M. Monitorização e modelagem na estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. 2003.

CAPÍTULO 2

Estabilização de proteases produzidas por *Bacillus sp.* na presença de milhocina

**João Caitano Alves Neto
Elaine Yara Santos de Oliveira
Nathália Trindade Pessôa
Alexandra Amorim Salgueiro**

Trabalho a ser submetido ao Archives of Microbiology

2.1 INTRODUÇÃO

Os micro-organismos são as principais fontes de enzimas industriais e especiais. Esses agentes microbiológicos possuem baixo tempo de duplicação, facilidade de cultivo e de manipulação genética com produção de compostos de interesse industrial pelo consumo de substratos (BON et al., 2008).

As enzimas, macromoléculas predominantemente constituídas de proteínas, são biocatalisadores indispensáveis a qualquer ser vivo uma vez que as mesmas são responsáveis por acelerar reações químicas que mantêm e regulam os processos vitais. Com os avanços científicos e tecnológicos, as enzimas passaram a exercer grande importância nos processos industriais, substituindo os catalisadores químicos, uma vez que essas macromoléculas atuam em temperatura e pH brandos. Além das vantagens econômicas, visto que diminuiu o gasto de energia elétrica, tempo, pressão, temperatura e corrosão dos tanques reacionais, colaborando para sua maior preservação. A produção de enzimas microbianas não depende das intempéries climáticas além da enorme biodiversidade de micro-organismos encontrados nos mais variados habitats (SAID, PIETRO, 2004).

O mercado mundial de enzimas industrial movimenta atualmente uma soma considerável de recursos que cresce anualmente desde a década de 80. As hidrolases constituem a classe de enzima de maior uso industrial. Nesse grupo, as proteases aparecem com destaque atingindo 75 % do total. As enzimas proteolíticas encontradas em animais, vegetais e micro-organismos, são amplamente distribuídas no meio ambiente e atualmente representam grande importância nas áreas econômica e industrial (RAO, NARASU, 2007). As proteases microbianas possuem características próprias tais como estabilidade e grande perspectiva nas indústrias de detergentes e alimentos por facilidade de se controlar parâmetros como pH e temperatura, além de grande eficiência na catálise (MUKHTAR, HAQ, 2008). A maioria das proteases microbianas são produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (FÉLIX, NORONHA, MARCO, 2004)

O grande questionamento na utilização de proteases está ligado ao elevado custo de obtenção. Para viabilizar a produção de enzimas de forma econômica, micro-organismos capazes de produzir de maneira mais eficiente são investigados (UYAR et al., 2011). Visto que a matéria-prima do meio de produção de qualquer

enzima contribui de forma significativa no custo de produção, o reaproveitamento de resíduos como fontes de nutrientes é uma estratégia que deve ser investigada, considerando as composições químicas ricas em fontes de carbono e de nitrogênio (REGINATO, TEIXEIRA, 2009).

Um outro fator que contribui para o reaproveitamento de resíduos em processos biotecnológicos, é a crescente e diversificada geração de resíduos nos meios urbanos que têm causado problemas ambientais enfrentados em países industrializados (CAMPOS, 2006).

Considerando a quantidade crescente de resíduos industriais no meio ambiente resultante do crescimento industrial, a importação de enzimas no Brasil e o aumento da utilização desses biocatalizadores em processos biotecnológicos, este trabalho investigou a produção e estabilização de proteases por amostras de *Bacillus sp* utilizando resíduos agroindustriais.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Micro-organismos

O isolamento das amostras de *Bacillus sp.* foi realizado a partir de larvicidas comerciais e de uma cultura de actinomiceto (isolado de líquens da Amazonas) contaminada. Essas amostras foram enriquecidas em 50 mL de Caldo Nutritivo (extrato de carne 5 g/L, peptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L) distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 125 mL e incubados a 37 °C sob agitação em orbital a 150 rpm. O pH do meio foi ajustado para 7,0 com solução de NaOH a 2 M. A técnica de esgotamento por estrias em placas de Petri contendo o meio agar nutritivo (AN), (extrato de carne 5 g/L, peptona 10 g/L, cloreto de sódio 5 g/L e Agar 15g/L), foi utilizada para dispersar o material enriquecido após 24 h de cultivo. As placas de Petri foram incubadas em estufa a 37°C por 24 h. Colônias isoladas foram transferidas para caldo nutritivo com objetivo de realizar o re-isolamento nas mesmas condições de trabalho.

As colônias re-isoladas de placas de Petri foram transferidas para tubos de ensaio, contendo o meio AN inclinado, incubados a mesma temperatura. Os tubos de culturas isoladas pura foram observadas macroscopicamente e microscopicamente para confirmar a obtenção de amostras de *Bacillus sp.* As culturas puras isoladas de *Bacillus sp.* foram mantidas em AN sob refrigeração e repicadas antes de iniciar os experimentos.

2.2.2 Caracterização de resíduos agroindustriais

As determinações físico-químicas foram realizadas segundo metodologia da EMBRAPA (1997).

Umidade – a umidade dos resíduos foi determinada através do equipamento Ultra-X, KARL KOLB, ajustado a uma temperatura de 59,6 °C; a pesagem foi realizada com o indicador da balança de porcentagem zero (0 %); foi estabelecido o tempo de secagem da amostra até estabilizar a temperatura. Durante o processo, foram verificadas as leituras em quatro escalas de cores: a negra (0 a 25 %), a azul (25 %

a 50 %), a amarela (0 % - 25 % + 50 % = 75 %) e a roxa (25 % + 75 % = 100 %). Os resultados foram expressos em percentual.

pH – para 10 g de cada amostra, foram adicionados 25 mL de água destilada, agitado com bastão de vidro individual e após uma hora foi determinado o pH em potenciômetro.

Carbono orgânico – 0,02 g de cada amostra foi pesada em balança analítica, colocada em frasco de Erlenmeyer e aquecida, durante 5 minutos em placa elétrica; em seguida, à amostra digerida, foi adicionada uma solução de dicromato de potássio, esfriada e adicionado: 80 mL de água destilada, 1 mL de ácido ortofosfórico e 3 gotas do indicador difenilamina; o material foi titulado com solução de sulfato ferroso amoniacal 0,1 N até o desaparecimento da coloração azul e o aparecimento da coloração esverdeada; o volume gasto foi utilizado para fazer os cálculos.

Nitrogênio – segundo a técnica do micro-Kjeldahl, amostras dos resíduos foram trituradas, pesadas em balança analítica; 0,4 g de cada amostra foi colocada em tubos de ensaio e adicionado 15 mL da solução ácida de sulfato de sódio; o material foi digerido em bloco digestor na temperatura inicial de 120 °C, ajustando sempre a temperatura até a completa destruição da matéria orgânica (cor azul claro); depois o material digerido foi esfriado, adicionado 25 mL de água destilada nos tubos, agitado e adicionado 2 gotas de solução de cloreto férrico; em seguida, foi distribuído 25 mL da solução de sulfato de sódio em cada frasco de Erlenmeyer, acrescentando cinco gotas do indicador misto; o material foi destilado com uma solução a 50 % de hidróxido de sódio e sulfato de sódio para alcalinizar; em seguida, o material foi titulado com ácido sulfúrico 0,01 mol/L até a mudança de coloração (cor róseo); os volumes gastos na bureta foram utilizados para fazer os cálculos.

2.2.3 Padronização do inóculo

As culturas jovens de bactérias 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, correspondente à absorbância em torno de 0,8 em 660 nm. A contagem em placa foi realizada pela técnica *pour plate* com o meio de cultura AN e as colônias enumeradas com 12 h de cultivo a 28 °C.

2.2.4 Condições de cultivo submerso

A produção de proteases foi inicialmente realizada em meios utilizando diferentes resíduos industriais a 0,5 % em caldo nutritivo, em triplicatas. Em seguida, experimentos foram realizados com a cultura de *Bacillus sp* selecionada, utilizando apenas os resíduos orgânicos isolados e combinados a 0,5 % em água destilada.

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 padronizado e mantidos sob agitação orbital de 150 rpm, à temperatura de 28 °C. Amostras do líquido metabólico foram centrifugadas a uma velocidade orbital de 5000 rpm por 10 min para decantar as células suspensas. Os sobrenadantes foram submetidos às determinações analíticas de pH (potenciometria) e de atividade proteolítica.

2.2.5 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 medidas de

absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro a 440 nm durante 30 min e as velocidades máximas das reações enzimáticas foram calculadas, utilizando o EXCEL. Uma unidade de atividade proteolítica foi definida como sendo a quantidade de enzima requerida para produzir uma variação de absorbância igual a uma unidade, sendo expressa em U/mL.

2.2.6 Ultrafiltração

A ultrafiltração foi realizada por membrana filtrante plana Ultracel-10 PLCGC (Pellicon XL[®]), sendo o tamanho dos poros da membrana correspondente a 10 kDa que de acordo com a referência comercial, a massa molar retida varia aproximadamente de 18 a 60 kDa. O líquido metabólico livre de células com atividade proteolítica foi filtrado, utilizando uma pressão na amostra de 2,5 bar. De acordo com a recomendação técnica do manual da MILLIPORE, a membrana para concentrar enzimas recomendada deve ter na sua composição celulose regenerada (PELLICON XL 50).

A amostra filtrada foi concentrada 2, 3, 4 e 5 vezes, separada em retentado (concentrado) e permeado que foram utilizados para determinar a atividade enzimática. O líquido concentrado que reteve o maior percentual de atividade proteolítica foi caracterizado e utilizado para investigar a formulação do produto final. Nessa etapa, foi utilizado um sistema de ultrafiltração tangencial no laboratório da Empresa Bioenzima (Caruaru, PE).

2.2.7 Caracterização do extrato proteolítico

O pH ótimo da atividade do líquido metabólico livre de células e concentrado duas vezes foi determinado no retentado com 0,2 % de azo-caseína como substrato, preparado em tampão Tris-HCl 0,1 M na faixa de pH de 8 a 11. A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme descrito anteriormente.

Para determinação da estabilidade ao pH, o líquido metabólico livre de células foi previamente ajustado com soluções tampões com valores de pH, variando entre 8 e 11. Em seguida, alíquotas foram retiradas para determinação da atividade enzimática após incubação durante os seguintes intervalos de tempo 30, 60 e 90 minutos.

A temperatura ótima para a atividade proteolítica do líquido metabólico livre de células foi determinada com o substrato preparado em tampão em pH ótimo. O sistema de reação (substrato e líquido metabólico concentrado duas vezes) foi incubado em diferentes temperaturas entre 30 e 70 °C, conforme descrito na metodologia da atividade enzimática.

A estabilidade da atividade enzimática quanto à temperatura foi determinada pela incubação do extrato enzimático concentrado duas vezes a 40, 50 e 60 °C por períodos de 30, 60 e 90 min. A atividade enzimática foi determinada como descrito anteriormente, em presença de 0,2 % de azo-caseína sob pH ótimo.

2.2.8 Formulação de líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica

Ao líquido metabólico de *Bacillus sp.* livre de células e concentrado duas vezes por membrana Millipore, foram adicionados: conservante microbiológico (sorbato de sódio a 0,5 %), indutor de proteases ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) e aditivos químicos que atuam como estabilizadores de enzimas, 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).

Tabela 1 Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^3 para formulação de líquido metabólico com atividade proteolítica

Fatores (%)	Níveis		
	-1	0	+1
CaCl₂ · 2 H₂O	0,1	0,5	0,9
Glicerol (P.A.)	5,0	7,5	10,0
Polietilenoglicol (PEG-200)	0,0	5,0	10,0

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Caracterização de resíduos agroindustriais

A tabela 2 ilustra os resultados das caracterizações físico-químicas (carbono e nitrogênio) de resíduos orgânicos. Os resíduos que apresentaram o maior teor de carbono foram cevada (34,44 %p/p) e soro de leite (32,00 %p/p), enquanto os que apresentaram maior teor de nitrogênio foram milhocina (32,54 %p/p) e soro de leite (11,09 %). Devido aos valores mais elevados de carbono e nitrogênio, esses resíduos foram selecionados e utilizados nos meios de produção de proteases, além do melaço de cana-de-açúcar devido à grande demanda desse resíduo orgânico na região.

A milhocina é uma mistura complexa de compostos, predominando proteínas na concentração de 20 %. Ressalta-se também a presença de aminoácidos, vitaminas e sais minerais que atuam como micronutrientes (DOMINGOS, 2009).

O resíduo de cevada gerado na fabricação de cerveja tem sido utilizado como suplemento na alimentação de gado e camarão. A fonte de carbono desse resíduo é constituída por 11 % de proteína bruta, 7 % de fibra e 1,3 % de material lipídico. A proteína também é utilizada como fonte de nitrogênio pelos micro-organismos. Esse resíduo contém fósforo, vários aminoácidos, fundamentais no metabolismo das bactérias, além de íons cálcio que apresentam efeito ativador nas proteases (NASCIMENTO, SILVA, 2007).

O soro de leite contém íons cálcio, além de açúcares (lactose), gorduras e proteínas (MIZUBUTI, 1994). O grande volume gerado desse resíduo na fabricação de queijo com elevado valor nutritivo, além do descarte sem tratamento prévio nos recursos hídricos tem impulsionado a pesquisa para investigação de alternativas para minimizar impactos ambientais negativos.

O melaço de cana-de-açúcar é um resíduo rico em fontes de carbono. Por outro lado, a concentração de nitrogênio é tão baixa que é necessário adicionar uma fonte de nitrogênio no cultivo de micro-organismos. A concentração de fósforo atinge apenas 0,015 % e por ser um elemento importante na produção de adenosinatrifosfato (ATP) principal fonte de energia nas células dos seres aeróbicos,

é fundamental que seja investigada a influência desse nutriente na formulação do meio de produção de enzimas nos cultivos submersos de micro-organismos (FELTRIN et al., 2000).

Tabela 2 Caracterização físico-química de resíduos agroindustriais

Resíduos industriais	Carbono	Nitrogênio
	(%p/p)	(%p/p)
Resíduo de cevada	34,44	1,41
Farela de trigo	26,89	1,03
Folha de macaxeira	26,50	1,54
Milhocina	27,58	32,54
Melaço de cana-de-açúcar	19,21	1,77
Farelo de soja	27,71	2,52
Soro de leite	32,00	11,09

O farelo de trigo é um resíduo que apresenta principalmente na sua composição carboidratos, 64 % e proteínas, 15 %. Muito rico em minerais ressaltando a presença de cálcio, ferro, magnésio e fósforo. No entanto, apresenta também presença de metais pesados como cobre e manganês, entre outros. Os metais interferem nas atividades enzimáticas como inibidores ou ativadores (MESQUITA, 2007).

O farelo de soja é composto basicamente por 48 % de proteínas e rico em material mineral (4,7 %), dentre os quais podem ser citados: cálcio 0,28 %, fósforo 0,59 %, sódio 0,03 % , cloro 0,05% e potássio 2,06 % (GERBER, PENZ, RIBEIRO, 2006).

Os percentuais de carbono e de nitrogênio dos resíduos selecionados foram utilizados para calcular as quantidades dos nutrientes nos meios de produção de proteases (tabela 2).

2.3.2 Seleção de amostras de *Bacillus sp.* produtoras de proteases

Doze amostras isoladas foram identificadas como *Bacillus sp.* - confirmadas macroscopicamente e microscopicamente - e enumeradas consecutivamente (I, II, ..., XII). A tabela 3 apresenta os resultados das atividades enzimáticas determinados em triplicata nos experimentos realizados em cultivo submerso com as culturas puras isoladas.

A maior atividade proteolítica determinada foi 41 U/mL cuja enzima foi produzida por uma das culturas isoladas, utilizando caldo nutritivo (tabela 3). Essa cultura pura foi selecionada para ser investigado o reaproveitamento de resíduos industriais como fonte nutritiva. O pH no tempo zero dos cultivos submersos, medido para todas as amostras após os meios serem autoclavados, foi em torno de pH 7,0. Após 24 h de cultivo submerso, o valor do pH aumentou em todos os experimentos atingindo o valor máximo de pH 8,5.

2.3.3 Investigação de resíduos industriais para produção de proteases por *Bacillus sp.*

A tabela 4 apresenta as atividades proteolíticas determinadas para a amostra de *Bacillus XI*, utilizando os resíduos industriais: milhocina, soro de leite, melaço, cevada, farelo de soja e farelo de trigo, como nutrientes na composição do meio de cultura. Os resíduos foram investigados visando à produção economicamente viável em grande escala de proteases.

A amostra isolada de *Bacillus sp. XI* foi cultivada na presença dos resíduos industriais em caldo nutritivo. A maior atividade proteolítica foi verificada na presença de milhocina (tabela 4). Foi determinada uma grande variação nas atividades proteolíticas, principalmente na presença de milhocina cujo desvio padrão foi elevado. Os resíduos contêm substâncias químicas que podem interferir na atividade da enzima. Provavelmente, essas estruturas combinam com aminoácidos essenciais à conformação tridimensional da proteína que altera a sua estabilidade, podendo aumentar ou diminuir a atividade (BUXBAUM, 2011).

Tabela 3 Atividades proteolíticas e pH em caldo nutritivo de amostras de *Bacillus sp.* isoladas

Amostras de <i>Bacillus</i>	Atividade proteolítica (U/mL)		
	Média	DP (\pm)	pH
<i>Bacillus sp. I</i>	4	2,2	8,2
<i>Bacillus sp. II</i>	8	1,3	8,3
<i>Bacillus sp. III</i>	4	4,1	7,9
<i>Bacillus sp. IV</i>	23	7,2	8,5
<i>Bacillus sp. V</i>	1	2,3	8,3
<i>Bacillus sp. VI</i>	2	1,7	8,5
<i>Bacillus sp. VII</i>	33	7,3	8,5
<i>Bacillus sp. VIII</i>	6	1	8,5
<i>Bacillus sp. IX</i>	32	4	8,4
<i>Bacillus sp. X</i>	3	2,1	8,4
<i>Bacillus sp. XI</i>	41	1,8	8,3
<i>Bacillus sp. XII</i>	30	5,2	8,5

Tabela 4 Atividades proteolíticas da amostra de *Bacillus sp. XI* em caldo nutritivo na presença de resíduos agroindustriais

Resíduo Industrial	Atividade proteolítica (U/mL)		
	Média	DP	pH
Cevada	23	5,7	7,9
Milhocina	40	27,8	7,8
Soro de leite	5	2,1	7,8
Melaço	20	6,7	7,7
Farelo de soja	16	3,0	8,5
Macaxeira	9,3	4,0	7,5
Farelo de trigo	21	14,3	8,3

A composição complexa de alguns resíduos contendo metais pesados pode interferir na atividade proteolítica. Por outro lado, os resíduos contêm diversos

micronutrientes que estimulam o crescimento dos micro-organismos. Quando os resíduos são derivados de um produto agrícola, a composição química é variável em função de diversos fatores como o cultivo, o clima, o solo, o processamento industrial, dentre outros. Por conseguinte, os resíduos contêm substâncias que interferem na atividade enzimática.

Nos cultivos submersos utilizando os resíduos industriais, o pH no tempo zero foi em torno de 7,0 cujo valor aumentou após 24 h de cultivo, atingindo o máximo de pH 8,3 (tabela 4). A produção de substâncias de caráter básico durante o cultivo das amostras de *Bacillus sp.* isoladas induz a possibilidade do extrato enzimático ser aplicado em formulação de detergente enzimático. O extrato enzimático para ser um ingrediente ativo em detergente, na formulação do produto final, deve apresentar eficiência em eliminar sujidades sob condições alcalinas (MARTINELLI et al., 2003).

Nos cultivos submersos das amostras de *Bacillus sp.*, em frascos de Erlenmeyer, ocorreu o aparecimento de película apenas na presença de alguns resíduos. O aumento da densidade do meio ou a presença de partículas sólidas dos resíduos dispersos no mesmo podem ter favorecido o crescimento da bactéria em forma de película (TRIVEDI, 2010).

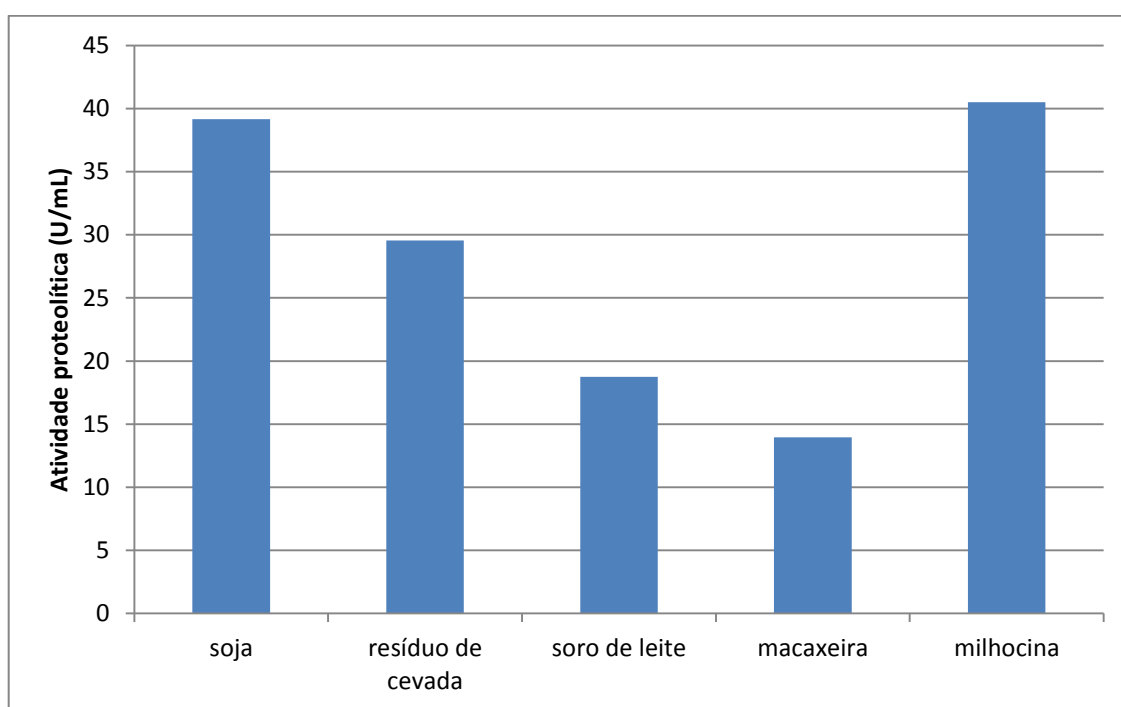
A formação e acumulação de biofilmes é resultado de vários processos de natureza física e biológica. Agregados microbianos presentes em separação de fases ar-líquido ou agregados flutuantes como flocos ou grânulos, enquadram-se igualmente na definição de biofilmes. Numerosos bioprocessos também utilizam biofilme. No entanto, o crescimento não desejado de biofilmes, em contrapartida, tem um impacto negativo em várias atividades, representando perdas significativas para indústrias em nível global. Tais problemas são agravados pela resistência acrescida a métodos de desinfecção e limpeza que os biofilmes demonstram, comparado com as células bacterianas livres. Em agregados microbianos suficientemente espessos, usuais em biofilmes, as distâncias difusionais são suficientemente grandes fazendo com que o transporte de solutos para as células bacterianas nos interiores se torne lento, em comparação com as cinéticas de bioprocessos dos micro-organismos com células livres. Nessas situações formam-se gradientes de solutos no biofilme e a transferência de massa torna-se num processo limitante para os bioprocessos (XAVIER et al., 2006).

2.3.4 Investigação da relação C/N para produção de proteases por *Bacillus sp.*

As figuras 1 e 2 ilustram os resultados de atividades proteolíticas produzidas pela amostra de *Bacillus sp.* XI, cultivada na presença dos resíduos orgânicos cevada, folha de macaxeira, milhocina, farelo de soja e soro de leite, utilizando diferentes proporções de C/N.

A complexidade e a variedade da composição química dos resíduos orgânicos, além dos resultados das atividades proteolíticas determinados, nortearam a composição do meio de produção de proteases por *Bacillus sp.* nesse trabalho. Conseqüentemente, a milhocina foi o resíduo agroindustrial selecionado por ter sido a condição nutritiva de atividade proteolítica máxima.

Figura 1 Atividades proteolíticas produzidas por *Bacillus sp.* na presença de resíduos orgânicos a 0,5 % dispersos em água após 24 h de cultivo submerso



A relação C/N de cada resíduo orgânico foi calculada em função dos teores de carbono e de nitrogênio determinados: cevada igual a 2/1; folha de macaxeira, 17/1; milhocina, 0,8/1; farelo de soja, 11/1 e soro de leite, 3/1. Conseqüentemente,

diferentes proporções de C/N foram investigadas, ressaltando que cada resíduo foi utilizado na concentração de 0,5 % no meio de produção de proteases.

Nesses experimentos, as maiores atividades proteolíticas determinadas foram 40,5 e 39,2 U/mL na presença de milhocina e farelo de soja, respectivamente, que têm aproximadamente C/N igual a 1 e 11 (figura 1). Não foi observada uma relação constante linear entre C/N e atividade proteolítica. Isso significa que tanto a relação C/N influencia a atividade quanto, outros componentes presentes nos resíduos investigados.

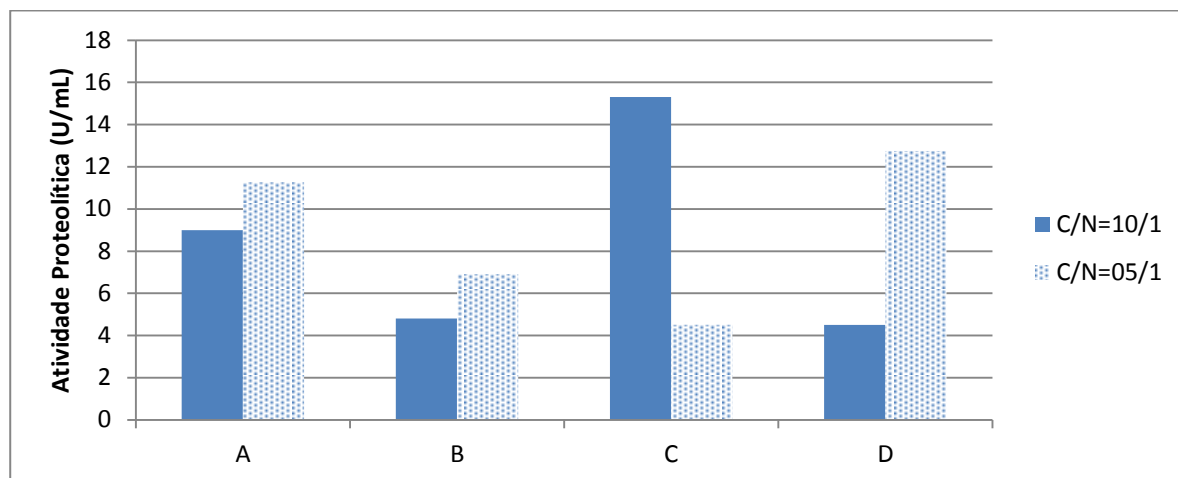
Os resultados obtidos da determinação da atividade proteolítica nos cultivos submersos utilizando dois resíduos orgânicos estão ilustrados na figura 2 quando foram investigadas as relações C/N iguais a 10/1 e 5/1.

A relação C/N influencia no comportamento do micro-organismo. Carlile e Watkinson (1997) produziram enzimas com diferentes proporções de fontes de carbono e de nitrogênio no meio de cultura e observaram que a relação C/N igual até 10/1 garante elevado conteúdo protéico.

Os valores de atividades determinados na presença de dois resíduos foram menores do que na presença de um único. O valor máximo de atividade determinado foi cerca de 50 % menor quando mais de um resíduo foi utilizado (figura 2).

A literatura apresenta resultados da fisiologia microbiana para produção de proteases por *Bacillus sp.* Delatorre e colaboradores (2010) utilizaram os resíduos milhocina, soro de leite e melaço de cana-de-açúcar na composição de meios de produção por cultivo submerso. Esses autores observaram que a presença de 0,3 % do melaço favoreceu o crescimento da bactéria e a produção de proteases. A maior produção dessa enzima foi na presença de 0,5 % de melaço, 0,1 % de soro de leite e 0,2 % de milhocina. Na composição desse meio de cultura, a relação C/N foi igual a 7,5/1.

Figura 2 Produção de proteases por *Bacillus sp.* nas proporções C/N iguais a 10/1 e 5/1, combinando dois resíduos orgânicos após 24 h de cultivo submerso



Legenda: A cevada + soro de leite;

B cevada + milhocina;

C macaxeira + soro de leite;

D macaxeira + milhocina.

2.3.5 Produção de proteases por *Bacillus sp.* sob cultivo submerso na presença de milhocina

A cultura de *Bacillus sp.* selecionada produziu 44,3 U/mL após 24 h de cultivo na presença do resíduo milhocina como única fonte de nutrientes a pH 7,0, sob agitação orbital de 150 rpm e à temperatura de 28 °C. Dois litros de líquido metabólico livre de células, apresentando pH final 8,0 com atividade proteolítica foram produzidos e armazenados sob refrigeração assepticamente, durante no máximo 24 h antes de ser filtrado por membrana Millipore.

2.3.6 Concentração de líquido metabólico livre de células com atividade proteolítica produzida por *Bacillus sp.*

A concentração do líquido metabólico na ultrafiltração pela membrana de Millipore de 10 kDa influenciou na atividade proteolítica do *Bacillus sp.*. A atividade e o fator de concentração foram inversamente proporcionais; isto é, quanto maior a concentração, menor a atividade proteolítica. Não foi determinada atividade quando o líquido metabólico foi concentrado cinco vezes.

A maior atividade proteolítica foi determinada quando o líquido metabólico foi concentrado duas vezes; o retentado atingiu 31 U/mL e o permeado, 6,6 U/mL. Comparando as atividades enzimáticas antes (44,3 U/mL) e depois de concentrar pela membrana (31 U/mL), substâncias químicas presentes no líquido metabólico que influenciavam na atividade proteolítica produzida pela cultura do *Bacillus* sp. permearam a membrana de Millipore de 10 KDa.

Apesar da diminuição do teor de água em bioprodutos com atividade catalítica estabilizar a estrutura tridimensional das proteínas, a concentração do líquido metabólico do *Bacillus* sp. por ultrafiltração tangencial precisa ser otimizada (ILLANES, 2006).

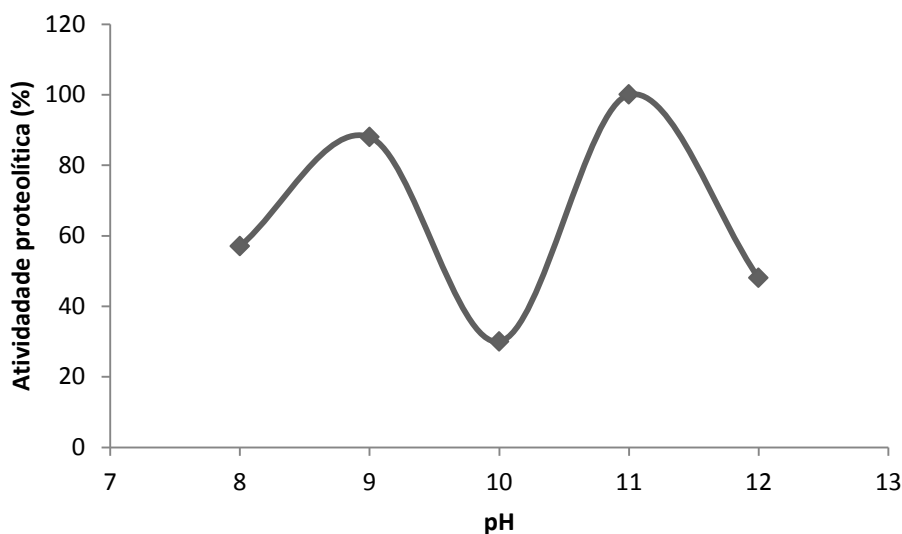
2.3.7 pH ótimo e estabilidade ao pH de líquido metabólico concentrado do *Bacillus* sp. com atividade proteolítica

A figura 3 apresenta os resultados de atividade proteolítica determinados no líquido metabólico livre de células produzido por *Bacillus* sp. na presença de milhocina. O extrato enzimático foi incubado em azo-caseína, preparada em tampão Tris-HCl 0,1 M em valores de pH na faixa de 8 a 12, à temperatura de 37 °C.

As enzimas, geralmente, exibem apenas um valor de pH ótimo embora o líquido metabólico livre de células obtido no cultivo do *Bacillus* sp. apresentou atividade máxima em pH 11 e foi determinado 88 % dessa atividade em pH 9 (figura 3).

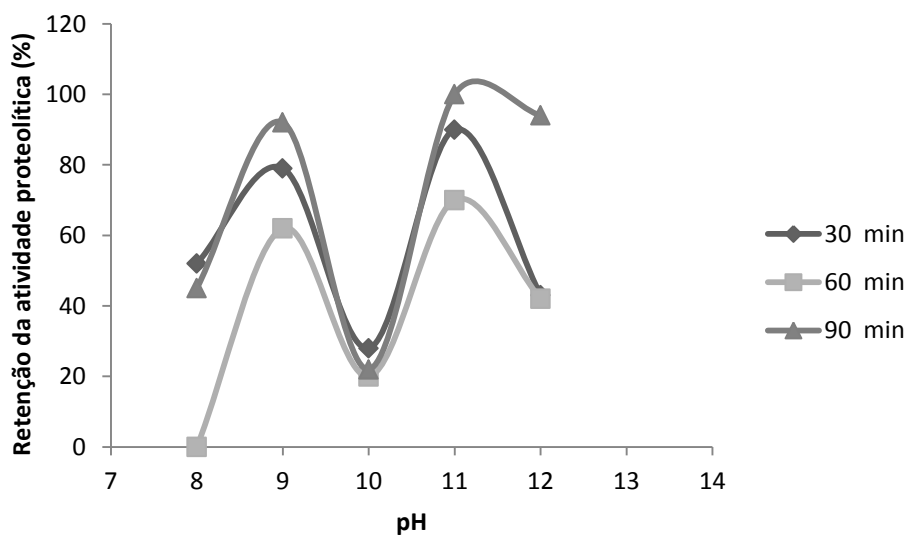
A atividade de uma enzima é influenciada pelo pH, considerando as diversas ligações eletrostáticas na estrutura tridimensional dentre outras interações nas cadeias polipeptídicas das proteínas que dependem do pH. Os estados de ionização dos grupos funcionais diretamente envolvidos na catálise e, possivelmente, suas naturezas químicas são fatores preponderantes nas atividades enzimáticas (MARANGONI, 2003).

Figura 3 pH ótimo de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração em tampão tris-HCl 0,1 M com atividade proteolítica produzida por *Bacillus sp.*



A figura 4 apresenta a estabilidade do líquido metabólico concentrado livre de células do *Bacillus sp.* durante 30, 60 e 90 minutos na presença do substrato (azocaseína), à temperatura de 37 °C.

Figura 4 Estabilidade ao pH de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração em tampão tris-HCl 0,1 M com atividade proteolítica produzida por *Bacillus sp.*



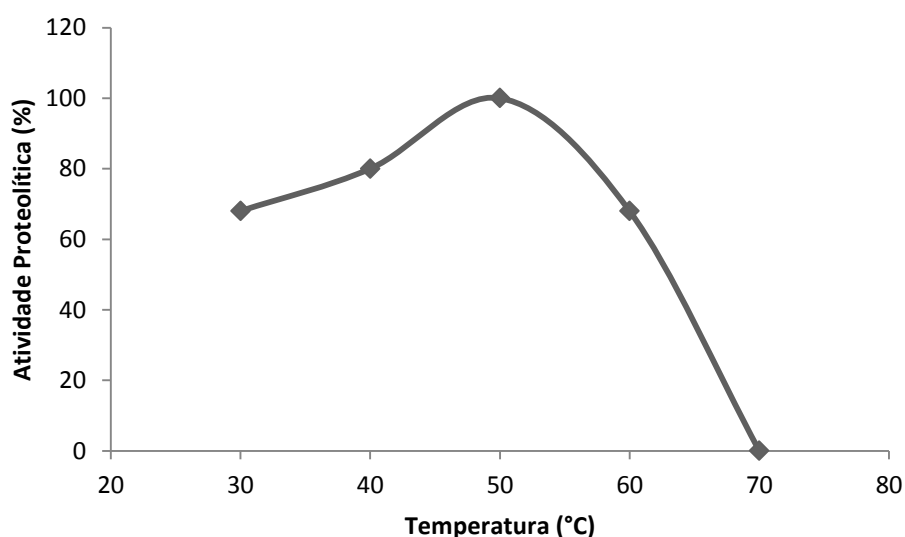
Comparando a figura 4 com a figura 3 (referente ao pH ótimo), ficou evidenciado o mesmo comportamento das proteases; isso é, as maiores estabilidades foram determinadas em pH 9 e 11, nos mesmos valores de pH em que a atividade proteolítica atingiu 90 – 100 % (valores ótimos).

Ressalta-se que a retenção de atividade aumentou com o tempo de incubação do líquido metabólico concentrado com atividade proteolítica. A grande estabilidade do líquido metabólico do *Bacillus* sp. em valores de pH alcalinos favorece futuras aplicações na formulação de detergentes (LADEIRA et al., 2012). Esses autores evidenciaram que proteases de *Bacillus* sp. apresentaram pH ótimo em torno de 8,5 e estabilidade ao pH na faixa de 6 a 12 cujos resultados viabilizam aplicações em diversos setores industriais, incluindo a formulação de detergentes.

2.3.8 Temperatura ótima e estabilidade térmica de líquido metabólico com atividade proteolítica

A figura 5 apresenta a temperatura ótima do líquido metabólico livre de células do *Bacillus* sp. determinada em pH 11.

Figura 5 Temperatura ótima em pH 11 de líquido metabólico, concentrado por ultrafiltração com atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp.



Os resultados obtidos evidenciaram um comportamento típico de enzimas. À medida em que a temperatura aumentou de 30 °C a 50 °C, a atividade também

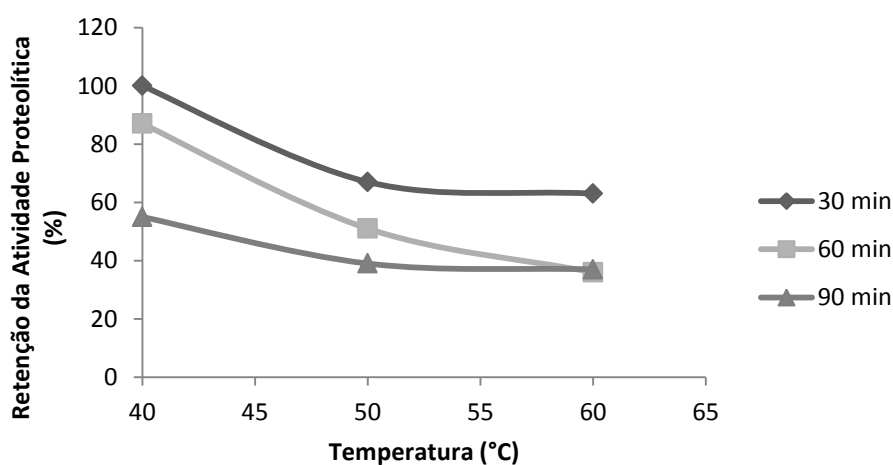
aumentou cujo valor máximo foi determinado a 50 °C. Em temperatura acima desse valor, ocorreu desnaturação da proteína e, conseqüentemente, a atividade diminuiu, não sendo determinada a 70 °C a atividade proteolítica do *Bacillus* sp..

Vários autores também determinaram temperatura ótima igual a 50 °C para proteases produzidas por diferentes cepas de *Bacillus* sp. (NAIDU, 2005; NASCIMENTO et al., 2007; DELATORRE et al., 2009).

Por outro lado, Nascimento e Martins (2006) produziram proteases a partir de cultura de *Bacillus* sp. na presença de soro de leite e milhocina, tendo sido determinado temperatura ótima igual a 70 °C. Ladeira et al. (2010) também determinaram temperatura ótima de proteases produzidas por *Bacillus* sp. a 70 °C e com relação à estabilidade térmica desse produto enzimático, foi retida 80 % da atividade máxima durante 2 h a 60 °C com redução drástica da atividade em temperaturas elevadas.

A figura 6 apresenta a estabilidade térmica do líquido metabólico concentrado, livre de células do *Bacillus* sp. em pH 11. As amostras em triplicatas foram previamente incubadas em banho-maria à temperatura de 40 a 60 °C e depois, a atividade proteolítica foi determinada conforme a metodologia (item 2.2.5). A atividade proteolítica diminuiu com o aumento da temperatura de incubação e do tempo de incubação (30 a 90 minutos).

Figura 6 Estabilidade térmica em pH 11 de líquido metabólico concentrado por ultrafiltração com atividade proteolítica produzida por *Bacillus* sp.



A maior estabilidade térmica foi determinada a 40 °C por 30 minutos, apesar da temperatura ótima dessa enzima ter sido 50 °C (figura 5). Comparando os valores de atividade a 40 °C, observou-se que cerca de 50 % da atividade não foi determinada quando o líquido metabólico foi incubado durante 90 minutos.

Dettmer e colaboradores (2010) investigaram a estabilidade térmica de proteases para aplicações na indústria de couros. Esses autores evidenciaram que várias amostras apresentaram em torno de 100 % da atividade apenas durante 30 minutos a 37 e 45 °C. Apenas uma amostra comercial apresentou grande estabilidade térmica: durante 120 minutos.

2.3.9 Planejamento fatorial 2³ para formulação do retentado do líquido metabólico contendo atividade proteolítica

A tabela 5 apresenta a atividade proteolítica com zero horas e a retenção de atividade proteolítica na presença de substâncias químicas estabilizadoras de acordo com os ensaios do planejamento fatorial. O líquido metabólico concentrado controle, antes de adicionar os aditivos da formulação apresentou 22 U/mL de atividade.

As maiores atividades proteolíticas do retentado formulado foram determinadas na presença de glicerol (7,5 %), CaCl₂ (0,5 %) e PEG-200 (5 %), cujo valor médio foi 196 U/mL (no ponto central, ensaios 9, 10, 11 e 12). Comparando com a amostra controle (sem formular), essa atividade proteolítica foi cerca de quatro vezes maior considerando que foi duas vezes concentrada. Por conseguinte, aditivos estabilizadores de proteínas e a presença de íons cálcio favoreceram a atividade enzimática. Essa atividade foi retida em torno de 69 % com 10 dias de incubação à temperatura ambiente.

A figura 7 ilustra a análise do diagrama de Pareto na formulação do líquido metabólico livre de células do *Bacillus sp.*, concentrado duas vezes e conservado com sorbato de sódio a 0,5 %. Essa figura apresenta o resultado obtido com as retenções de atividade proteolítica com 30 dias de armazenamento a 28 °C que apresenta efeitos estatisticamente significativos.

Considerando os efeitos das variáveis investigadas, a estabilidade do líquido metabólico foi favorecida pela diminuição da concentração do glicerol e pelo aumento das concentrações de CaCl_2 e de PEG-200 nas faixas investigadas (tabela 1). Ressalta-se que as interações entre as variáveis glicerol e PEG-200 e entre, CaCl_2 e PEG-200 foram negativas, isto é, o aumento das concentrações dessas variáveis combinadas, diminui a estabilidade do retentado.

Tabela 5 Atividades proteolíticas e retenção da atividade do retentado na presença de aditivos com 0, 10, 20 e 30 dias de armazenagem a 28 °C

Ensaio	Fatores (%)			Atividade proteolítica (U/mL)	Retenção da atividade (%)		
	CaCl_2	Glicerol	PEG	0 h	10 dias	20 dias	30 dias
1	0,1	5	0	20,25	60	56	4
2	0,9	5	0	20,25	70	70	67
3	0,1	10	0	26,25	83	66	43
4	0,9	10	0	5,00	75	-	-
5	0,1	5	10	3,75	60	-	-
6	0,9	5	10	37,50	90	2	-
7	0,1	10	10	15,75	95	43	19
8	0,9	10	10	102,00	92	55	44
9	0,5	7,5	5	215,25	61	23	19
10	0,5	7,5	5	220,50	64	23	20
11	0,5	7,5	5	172,50	77	31	27
12	0,5	7,5	5	176,25	75	29	25

Segundo Ghorbel et al (2003, apud Ladeira et al 2012), a presença do Ca^{+2} impede a desnaturação das proteases através de ligações desses íons no sítio ativo da enzima.

O glicerol é essencial na estabilidade de líquido metabólico livre de células com atividade enzimática (ILLANES, 2008). Nesse trabalho, a concentração de 7,5 % de glicerol resultou na maior atividade proteolítica do *Bacillus sp.*. O diagrama de

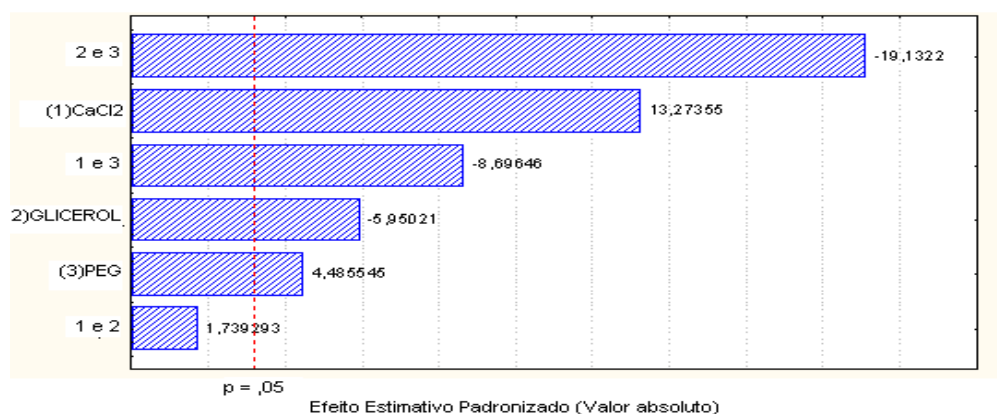
Pareto ilustra que o aumento da concentração dessa variável de 5 a 10 % na formulação do líquido metabólico não favoreceu o aumento da sua estabilidade.

Durante 30 dias de armazenamento, o efeito do PEG foi positivo, (figura 7), isto é, o aumento de sua concentração na formulação do líquido metabólico favoreceu o aumento da estabilidade do retentado. Ressalva-se que a zero horas, as formulações na ausência de PEG apresentaram valores baixos de atividade proteolítica (ensaios 1, 2, 3 e 4).

As retenções de atividades proteolíticas médias determinadas no líquido metabólico livre de células e concentrado diminuíram durante o armazenamento. Os valores máximos (92 - 95 %) foram determinados com 10 dias na presença de 10 % de glicerol e 10 % de PEG-200, independente da concentração de CaCl_2 (ensaios 7 e 8, respectivamente).

Ressalta-se que o formulado enzimático contendo 0,5 % de CaCl_2 , 7,5 % de glicerol e 5 % de PEG reteve em torno de 69 % da atividade proteolítica do líquido metabólico e concentrado do *Bacillus sp.* com 10 dias de armazenamento à temperatura ambiente. Enquanto com 30 dias de armazenamento, a retenção de atividade diminuiu, atingindo apenas 23 %. Logo, é necessário que outras formulações sejam investigadas considerando que a refrigeração durante o armazenamento eleva os custos do produto final e, conseqüentemente, inviabiliza a competitividade na comercialização.

Figura 7 Diagrama de Pareto dos efeitos padronizados para análise dos fatores dos ensaios, em resposta a estabilidade da atividade proteolítica do produto formulado com 30 dias de armazenamento a 28 °C.



2.4 CONCLUSÕES

- Resíduos industriais - ricos em fontes de carbono e de nitrogênio - podem ser reaproveitados como nutrientes em processos biotecnológicos;
- Culturas isoladas de *Bacillus sp.* produzem proteases na presença de milhocina sob cultivo submerso;
- A formulação de líquido metabólico com atividade proteolítica, concentrado duas vezes por ultrafiltração, que apresenta estabilidade térmica em pH alcalino é um bioproduto que pode ser utilizado como aditivo em detergentes.

2.5 REFERÊNCIAS

BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008.

BUXBAUM, E. **Biophysical chemistry of proteins**, Springer, New York, 2011.

CAMPOS, F. S. Uso de lodo de esgoto na reestruturação de um latos solo vermelho degradado, 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia, São Paulo

DELATORRE, A. B.; ANDRADE M. V. V.; LADEIRA S. A.; PEREZ V. H.; MARTINS M. L. L.. Utilization of agroindustrial residues for sp SMIA-2. **Ciência e Cultura: Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário da FEB**, Barretos, v. 4, nº 1, p. 41-46, 2009.

DETTMER, A.; GUITTERRES, M.; AYUB, M. A. Z. Biotecnologia para a produção mais limpa de couros. **IX OKTOBERFÓRUM- PPGEQ**. Porto Alegre, 2010.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. **Manual de Métodos de Análises de Solos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA. 1997.

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.115-129, 2004.

GERBER, L.F.P.; PENZ M.J.; RIBEIRO, A. M. L. Efeito da composição do farelo de soja sobre o desempenho e o metabolismo de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol. Pag. 2006.

ILLANES, A. **Enzymes Biocatalysis principles and applications**, Springer, Valparaíso, Chile, 2008.

LADEIRA, S. A. Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp* em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. **Química Nova**, v.33, n.2, p. 324-325, 2010.

MARANGONI, A. G. **Enzyme kinetics**, John Wiley Sons, New Jersey, 2003.

MUKHTAR, H.; HAQ, I. Production of alkaline protease by *Bacillus subtilis* and its application as a depilating agent in leather processing, **Institute of Industrial Biotechnology**, vol, pag, G.C. University, Lahore, 2008.

NAIDU, K. S. B.; DEVI, K. L. Optimization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. **African Journal Biotechnology**, vol4, p.724-726, 2005.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. **Ciência e tecnologia de alimentos**, vol 27 (2), Campinas: 2007

NASCIMENTO, W. C. A.; MARTINS, M. L. L. Produção de proteases por *Bacillus Sp* SMIA-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.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia - Conceitos e Aplicações**. 2.ed. Vol 2, São Paulo: Makron Books, 1996.

RAO, K.; NARASU, M. L. Alkaline protease from *Bacillus firmus* 7728. **African Journal of Biotechnology**, Hyderabad – India, Vol. 6, n. 21, p. 2493-2496, 2007.

REGINATO, E.; TEIXEIRA, M. L. Avaliação do potencial biotecnológico de bactérias do gênero *Bacillus* na degradação de resíduos de pele suína na indústria alimentícia. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.11, n.1, p.81-86, 2009

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R., Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, p.1-3, 2004.

SANTOS, R. C.; CAMPOS, J. F.; PINHEIRO, C. D.; TOLON, Y. B.; SOUZA, S. R. L.; BARACHO, M.; CARMO, E. L. de. Composting plants as alternative to the problematic one of the dumpsters in the urban way. **Enciclopédia biosfera**, Minas Gerais, vol. n. 2, p. 37, 2006.

SILVEIRA, G. G. **Resíduos Agroindustriais como potenciais substratos para a produção de renina microbiana por *mucor miehei* utilizando fermentação em estado sólido**. 2007. Dissertação (Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas - microbiologia aplicada). Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

TRIVEDI P.C. PANDEY S. BHADAURIA S. **Text book of microbiology**. Aavishkar Publishers: India. 2010.

UYAR, F.; PORSUK, I.; KIZIL, G.; YILMAR, E. I. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA 15. **Eurasian Journal of Biosciences**. Vol, pag. 2011

XAVIER, J. B.; Piciooreanu C., Almeida J. S., van Loosdrecht .M. C. M. Monitorização e modelagem na estrutura de biofilmes. **Boletim de Biotecnologia**. 2003.

CAPÍTULO 3

3.1 Conclusões gerais

- Os resíduos de produção agroindustrial brasileira podem ser reaproveitados em processo biotecnológico como nutrientes de micro-organismos;
- A fisiologia microbiana da produção de proteases é influenciada pela composição dos meios de produção contendo resíduos agroindustriais;
- A estabilidade da atividade e a caracterização de produtos enzimáticos é essencial por influenciar a vida útil do produto comercializado e a sua “performance” durante a aplicação;
- Pesquisas de produção de enzimas microbianas visando ao desenvolvimento de tecnologia precisam ser incentivadas para reduzir a importação desse metabólito no Brasil.

3.2 Sugestões

- “Screening” e modificações genéticas de micro-organismos devem ser realizadas visando à seleção de cultura microbiana competitiva com os produtores de proteases comerciais;
- A otimização da produção microbiana de proteases é imprescindível para reduzir os custos do produto final;
- Investigações na presença de outras substâncias estabilizadoras precisam ser realizadas em novas formulações de líquidos metabólicos concentrados com atividade proteolítica para aumentar a estabilidade do bioproduto.