

APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE
MARACUJÁ PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E α -AMILASES POR *Bacillus*
sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2011

APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE
MARACUJÁ PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E α -AMILASES POR *Bacillus*
sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^a. Ph.D Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO – 2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF

018/2011

Barbosa, João Batista

Aproveitamento de soro de queijo e farinha da casca de maracujá para produção de proteases e α -amilases por *Bacillus sp.* SMIA-2/ João Batista Barbosa. – 2011. 95f.

Orientador: Meire Leis Leao Martins

Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2011.

Bibliografia: f. 65 – 78.

1. Protease 2. α -amilases 3. Soro de queijo 4. Farinha da casca de maracujá 5. *Bacillus sp.* I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD - 664

APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE
MARACUJÁ PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E α -AMILASES POR
Bacillus sp. SMIA-2

JOÃO BATISTA BARBOSA

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e
Tecnologias Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,
como parte das exigências para obtenção do título
de Mestre em Produção Vegetal.

Aprovada em 17 de Fevereiro de 2011.

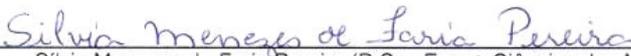
Comissão Examinadora:



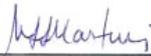
Prof. Maurilio Lopes Martins (D.Sc., Microbiologia Agrícola) – IF Sudeste MG



Prof. Eder Dutra de Resende (D.Sc., Engenharia Química) – UENF



Sílvia Menezes de Faria Pereira (D.Sc., Eng. e Ciências dos Materiais) – UENF



Prof.^a. Meire Leis Leal Martins (Pb.D., Molecular Biology and Biotechnology) – UENF
(Orientadora)

Dedico esta conquista aos meus pais

Sebastião e Maria Auxiliadora.

Amo vocês d+!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS pelo dom da vida e por todas as bênçãos concedidas, sem Ele nada teria sentido;

A Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo;

À professora Meire Lelis Leal Martins pela orientação, incentivo e apoio durante o curso;

Aos professores integrantes da banca examinadora, Dr^a. Sílvia, Prof. Dr. Maurilio e Prof. Dr. Éder pela colaboração neste trabalho e por terem aceitado participar da banca;

Aos professores do IF Campus Rio Pomba, MG: Dr. Maurilio, Msc. Eliane, Dr^a. Aurélia, Dr^a. Vanessa e Dr. Maurício pelo imenso apoio e incentivo desde o curso de graduação;

À pesquisadora da EPAMIG Dr^a. Cláudia Lucia de Oliveira Pinto e ao Gerente de Apoio Técnico/Queijos da DANISCO BRASIL Ph.D. Múcio Mansur Furtado pela presteza e colaboração;

Ao Cleiton (Técnico do Laticínios/IF Campus Rio Pomba), pela amizade, apoio e incentivo em minha vida profissional;

À empresa ALIBRA INGREDIENTES LTDA pela doação de amostras de soro para realização deste trabalho;

Ao setor de Engenharia do Frio em Alimentos pela doação de amostras de farinha da casca de maracujá;

Às amigas e companheiras de trabalho Natiele, Érika, Silvania e Andréia que sempre estiveram ao meu lado na condução deste trabalho e em outros momentos;

À minha amiga e namorada Simone, pelo amor, carinho, cumplicidade, incentivo e apoio em todos os momentos;

Às demais colegas do setor de Microbiologia Industrial e de Alimentos: Luciana Salles, Luciana Coutinho, Vanessa e Priscila pela colaboração e amizade;

À técnica Valdinéia e ao secretário Paulo, pela colaboração;

Às técnicas Ana Lúcia Paes Barbosa e Dr^a Sílvia Menezes de Faria Pereira, por toda atenção, pelos seus ensinamentos, incentivo, puxões de orelha, amizade e carinho;

Aos demais colegas do LTA, principalmente Geraldo, Natália, Shalline, Isabela e Clara pela boa convivência e amizade;

Aos meus amigos e companheiros de estudo Jorge Romero (Colômbiano) e Neila pela amizade e excelente companhia durante nossos estudos;

Às novas amigadas conquistadas durante o curso de mestrado: Raphael, Natália, Daniel, Validoro, Raquelzinha, Carol, Priscilla, Jéssica, Renata, Leandro, Shalline, Ronald, Rodrigo (Taílson), Lidiane, Bárbara, Tarcísio, Thiago (Butuca), Weverton (Negão), Jean, Juliano, Júlio, Igor e Marlon;

Às amigadas conquistadas no período de graduação Gabi, Felipe, Chrystina, Alan, José Pedro, Nanda, Diana, Nisael, Cleiton e Rosélio pelo carinho;

Aos meus amigos de Visconde do Rio Branco-MG, Régis, Paulim, Alan, Renato, Raissa, Ana Lúcia, Wanderson (Dedê), Vandinha, Jader, Naty, Adriana (Dedê), que mesmo estando longe sempre me apoiaram;

Aos meus pais Tatão e Dorinha que mesmo sem ter estudo sempre me incentivaram com muito amor e dedicação;

Aos meus irmãos (Fernando, Oldair, Valtecir, Mario Sérgio e José Carlos), aos meus avós (Jair e Lília), às minhas cunhadas (Claudinéia, Sônia, Vilma,

Simone e Valquíria) pelo imenso incentivo, respeito e amor sempre demonstrado. Agradeço-lhes por acreditarem no meu potencial;

Em especial ao meu irmão Valtecir, por acreditar em mim, por toda colaboração de forma material e por ser um dos grandes responsáveis pelo que já conquistei;

À minha tia-avó Yolanda que foi umas das pessoas precursoras de minha formação profissional, pelo carinho;

Aos meus sobrinhos (Tayná, Ricardo, Kauã, Joyce, Karyne, Kauane e Laiane), pelo carinho;

Aos meus primos, em especial: Welton, Fabiana, Mayara, Laura (afilhada), Erinalda, Anderson, Aline e Erivelton pelo carinho e apoio;

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. CLASSIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS.....	3
2.2. CARACTERÍSTICAS DOS MICRO-ORGANISMOS TERMOFÍLICOS E SUAS ENZIMAS.....	5
2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS.....	9
2.4. PROTEASES.....	10
2.5. AMILASES.....	11
2.6. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS.....	13
2.7. SORO DE QUEIJO.....	14
2.8. FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ.....	17
3. TRABALHOS.....	19
3.1. UTILIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus</i> sp.....	19

RESUMO.....	20
ABSTRACT.....	20
3.1.1. INTRODUÇÃO.....	20
3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1.2.1. Micro-Organismo.....	22
3.1.2.2. Preparação do meio de cultura e condições de fermentação.....	23
3.1.2.3. Preparo do pré-inóculo.....	23
3.1.2.4. Efeito da composição do meio de cultura na produção da enzima.....	23
3.1.2.5. Ensaio enzimático.....	24
3.1.2.6. Efeito do pH sobre a atividade de proteases e estabilidade.....	24
3.1.2.7. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade.....	25
3.1.2.8. Análises estatísticas.....	25
3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
3.1.4. CONCLUSÕES.....	34
3.1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	35
3.2. UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE E α -AMILASE PELO TERMOFILICO <i>Bacillus</i> sp.....	40
RESUMO.....	40
ABSTRACT.....	41
3.2.1. INTRODUÇÃO.....	42
3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.2.2.1. Micro-organismo e condições da cultura.....	43
3.2.2.2. Ensaio enzimático.....	44
3.2.2.3. Determinação da atividade da α -amilase.....	44
3.2.2.4. Determinação da atividade da protease.....	45
3.2.2.5. Caracterização parcial da α -amilase e protease.....	45
3.2.2.5.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e	

protease.....	45
3.2.2.5.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e protease.....	46
3.2.2.6. Análises estatísticas.....	46
3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.2.4. CONCLUSÕES.....	59
3.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
4. RESUMO E CONCLUSÕES.....	63
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

LISTA DE FIGURAS

		Página
	3.1. UTILIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO TERMOFÍLICO <i>Bacillus sp.</i>.....	19
1	Crescimento (A) e atividade da protease (B) de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado em diferentes concentrações de soro de queijo em pó a 50°C por 48 horas.....	26
2	Crescimento (A) e atividade da protease (B) de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado em soro de queijo (0,5% p/v) e diferentes co-substratos a 50°C por 48 horas.....	28
3	Efeito da concentração de farinha da casca do maracujá sobre o crescimento (A) e atividade da protease (B) de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado em 0,5% p/v de soro de queijo a 50°C por 48 horas.....	29
4	Crescimento (●), atividade de protease (▲) e alteração do pH do meio (■) em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 em soro de queijo 0,5% (p/v) e 0,25% (p/v) de farinha da casca de maracujá a 50°C.....	30
5	Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da protease secretada por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 quando cultivado a 50°C por 72 horas sob temperaturas de 60°C (■), 70°C (●), 80°C (▲) e 90°C (▼). 100% da atividade da enzima = 10,84 U/mL.....	32

6	pH ótimo (A) e estabilidade (B) da protease secretada por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 quando cultivado a 50°C por 72 horas. 100% da atividade da enzima = 10,23 U/mL.....	33
	3.2. UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE E α-AMILASE PELO TERMOFILICO <i>Bacillus sp.</i>.....	40
1	Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 contendo soro de queijo (0,5%, p/v) e diferentes fontes de amido (0,5%, p/v) a 50°C e 150 rpm por 72 horas.....	47
2	Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 contendo soro de queijo (0,5%, p/v) e farinha de maracujá e/ou farelo de aveia a 50°C e 150 rpm por 72 horas.....	49
3	Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 contendo soro de queijo (0,25%, p/v) e farinha de maracujá (0,15%, p/v) a 50°C e 150 rpm.....	51
4	Crescimento (■), produção de amilase (▲), produção de protease (▼) e pH do meio de cultura (●) em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado em 0,5% (p/v) soro de queijo, suplementados com 0,25% (p/v) de farinha da casca de maracujá e minerais.....	52
5	Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) de α -amilase [(■) 80°C; (●) 90°C; (▲) 100°C] produzida por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 178,82 U/mL).....	54
6	Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) de protease [(■) 60°C; (●) 70°C; (▲) 80°C] produzida por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade	

	da enzima = 14,24 U/mL).....	55
7	pH ótimo (A) e estabilidade (B) de α -amilase produzida por <i>Bacillus sp.</i> SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 129,71 U/mL).....	57
8	pH ótimo (A) e estabilidade (B) de protease produzida por <i>Bacillus sp.</i> cultivado em meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 14,33 U/mL).....	58

RESUMO

BARBOSA, João Batista; M.Sc. Produção Vegetal. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro, 2011. APROVEITAMENTO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ PARA PRODUÇÃO DE PROTEASES E α -AMILASES POR *Bacillus sp.* SMIA-2. Orientadora: Prof^a: Ph.D Meire Lelis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), em Campos dos Goytacazes-RJ, com o objetivo de estudar a produção de proteases e α -amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2 e avaliar algumas de suas características. *Bacillus sp.* SMIA-2 produziu protease quando cultivado em solução (0,5% p/v) de soro de queijo em pó (SQP) suplementado com farinha da casca de maracujá (0,25% p/v) e atingiu um máximo em 72 horas, com níveis de 11,40 U/mL. Estudos sobre a caracterização da protease demonstraram que a temperatura ótima desta enzima foi de 70°C. Em relação à termoestabilidade, foi demonstrado que a enzima manteve 70% da atividade original após 30 minutos de incubação a 60°C e a 70°C, 65% da atividade original foi mantida após 15 minutos. O pH ótimo da enzima foi 9,0 e a mesma foi estável em pH entre 6,0 e 9,0, sendo maior estabilidade observada em pH 8,5 e 9,0. A produção simultânea de α -amilase e protease por *Bacillus sp.* SMIA-2 foi também investigada em culturas em batelada contendo soro de queijo em pó e farinha da casca de

maracujá. As maiores atividades de α -amilase e protease foram obtidas quando o micro-organismo foi cultivado no meio contendo 0,5% (p/v) de soro de queijo e 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá. A suplementação do meio de crescimento com metais aumentou a atividade de ambas as enzimas e o crescimento do micro-organismo. Estudos sobre a caracterização das enzimas revelaram que as características mais importantes foram a alta temperatura ótima para atividade da α -amilase (90°C) e da protease (70°C). A α -amilase e protease mantiveram 21,17% e 65,98% de sua atividade máxima quando incubadas a 90°C e 70°C, respectivamente, por 15 minutos. A atividade ótima da α -amilase foi encontrada em pH 8,0 enquanto a da protease em pH 9,0.

ABSTRAT

BARBOSA, João Batista; M.Sc. Vegetal Production. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February, 2011. UTILIZATION OF CHEESE WHEY AND FLOUR PASSION FRUIT PEEL FOR PRODUCTION OF PROTEASES AND α -AMYLASES BY *Bacillus sp.* SMIA-2. Prof^a. Adviser: Ph.D Meire Lelis Leal Martins.

The present work was carried out at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos of the Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, (UENF), in Campos dos Goytacazes (RJ) city, with the objective of studying the production of α -amylase and protease by thermophilic *Bacillus sp.* SMIA-2 and evaluate some of its characteristics. *Bacillus sp.* SMIA-2 produced protease when cultivated in cheese whey powder (CWP) solutions (0.5%, w/v) supplemented with flour passion fruit peel (0.25%, w/v) and reached a maximum at 72 h, with levels of 11,40 U/mL. Studies on the protease characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 70°C. Thermostability profile indicated that the enzyme retained 70% of the original activity after 30 min of heat treatment at 60°C. At 70°C, 65% of the original activity was retained after 15 min of heat treatment. The optimum pH of the enzyme was found to be 9.0. The enzyme was stable between pH 6.0 and 9.0 and higher stability was observed at pH 8.5 and 9.0. The simultaneous production of α -amylase and protease by the thermophilic *Bacillus sp.* SMIA-2 was also investigated in batch cultures using powder cheese whey and

passion fruit peel flour. The highest activities of α -amylase and proteases were reached when the micro-organism was cultivated in a medium containing 0.5% (w/v) powder cheese whey and 0.15% (w/v) passion fruit peel flour were found in the stationary phase. The supplementation of the culture medium with metals improved the production of both enzymes and the growth of the microorganism. Studies on the enzymes characterization revealed that the most important kinetic properties of the enzymes were the high temperature optima of α -amylase and protease (70°C). The α -amylase and protease retained about 21.17% and 65.98% of its maximum activity when incubated at 90°C and 70°C, respectively, for 15 minutes. The optimum activity of the α -amylase was found to be in pH 9.0 while the protease in pH 8.5.

1. INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertence ao grupo das hidrolases (Oliveira *et al.*, 2006), dentre as quais se destacam as amilases e proteases (Ghorbel *et al.*, 2003). Estas enzimas podem ser obtidas por meio de plantas, animais e micro-organismos. No entanto, apenas as enzimas produzidas por micro-organismos atendem às demandas industriais devido ao curto tempo de geração e alta velocidade específica de crescimento das bactérias e de produtividade e termoestabilidade da enzima, o que viabiliza seu uso (Buzzini e Martine, 2002).

Bactérias do gênero *Bacillus* produzem uma variedade de enzimas extracelulares importantes tais como amilases e proteases, celulasas, poligalacturonases dentre outras. Estas bactérias são capazes de multiplicar sob condições extremas de temperatura e pH e originar produtos estáveis em ampla faixa de ambientes adversos (Wang *et al.*, 2007). Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui o *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos que não produzem toxinas e são incluídas no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Mahmood *et al.*, 1998).

A descoberta de micro-organismos termofílicos abriu novas oportunidades para a descoberta de enzimas que possuem atividade em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999). As enzimas termofílicas têm se mostrado tolerantes a agentes desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, sendo então, de interesse em vários processos industriais (Atomi, 2005).

Entretanto, o maior empecilho ao uso de enzimas em processos industriais está relacionado ao alto custo desse catalisador. Tendo em vista que o substrato para o crescimento do micro-organismo responde por 30 a 40% do custo da produção de enzimas em escala industrial (Joo e Chang, 2005), o estudo de alternativas a fim de baratear o processo torna-se interessante. Os resíduos agroindustriais, tais como os derivados da indústria de laticínios são recursos baratos utilizados na geração de produtos de alto valor comercial. Além disso, a produção de mais de uma enzima em um só passo fermentativo aumenta significativamente a eficiência e a economia do processo. Isto é especialmente importante para a produção de amilases e proteases, que respondem por cerca de 30% e 60% do mercado industrial de enzimas, respectivamente (Merheb *et al.*, 2007; Van der Maarel *et al.*, 2002; Siso, 1996).

O Brasil importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana, etc.), que constitui substrato de baixo custo para fermentações e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos micro-organismos produtores de enzimas de interesse industrial (Do Canto e Menezes, 1995).

Considerando as aplicações tecnológicas de enzimas nas condições que a indústria exige, o grupo de enzimas atualmente conhecido não é suficiente. Desta forma, a busca por fontes microbianas que produzem enzimas com novas propriedades é um tema de grande relevância para a comunidade científica. Neste contexto, a bactéria termofílica *Bacillus sp.* estirpe SMIA-2, utilizada neste trabalho, foi isolada de amostras de solo da região Norte Fluminense do estado do Rio de Janeiro (Souza e Martins, 2001) e sua capacidade em produzir α -amilases, proteases e poligalacturonases estudada (Nascimento e Martins, 2004), Carvalho *et al.* (2008a), Carvalho *et al.* (2008b), Cordeiro e Martins (2009) e Ladeira *et al.* (2010). No presente trabalho, foi estudado a produção de proteases e α -amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2, utilizando substratos orgânicos de baixo valor comercial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. CLASSIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DAS ENZIMAS

Enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica (Lima *et al.*, 2001) e são biocatalisadores com excelentes propriedades, tais como elevada seletividade e especificidade, que lhes permitem realizar uma grande variedade de processos químicos sob diversas condições reacionais (Dixon e Webb, 1979). Sua função metabólica exerce influência específica sobre certas interações bioquímicas, usualmente em ambientes muito complexos - como no interior de células - e incluem transformações oxidativas e conjugativas, que ocorrem em altas velocidades catalíticas e com reações altamente seletivas e específicas (Markoglou e Wainer, 2003; Koeller e Wong, 2001).

Segundo Lima *et al.* (2001), as enzimas são classificadas em seis grupos, de acordo com a reação catalisada:

- ✓ *Oxirredutases*: Catalisam reações de oxido-redução;
- ✓ *Transferases*: Catalisam reações de transferência de grupos de uma molécula a outra;
- ✓ *Hidrolases*: Catalisam reações de hidrólise;
- ✓ *Liases*: Catalisam reações de quebra de ligações, formando dupla ligação ou, ainda, catalisam a adição de grupos a duplas ligações;
- ✓ *Isomerases*: Catalisam reações de mudança intramolecular em que um substrato é transformado em um produto isômero;
- ✓ *Ligases*: Catalisam a ligação covalente de moléculas com simultânea quebra de uma ligação de alta energia;

As enzimas são ferramentas úteis devido a possíveis aplicações em diferentes setores, como nas indústrias alimentícia, têxtil, de papel e na agricultura, resultando em reduções significativas de custos (Hasan *et al.*, 2006). A tecnologia de enzimas é um campo multidisciplinar sendo reconhecida pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCED) como importante componente do desenvolvimento industrial sustentável (Cardoso, 2009).

Devido à sua vasta aplicação industrial, assim como no campo farmacêutico (Rao *et al.*, 1998), as proteases formam o grupo mais estudado das hidrolases. Por outro lado, as amilases e celulasas, comumente utilizadas nas indústrias de amido, têxtil e detergente, representam o segundo maior grupo de enzimas (Godfrey e West, 1996). Segundo Hartzell e Hsieh (1998) e Tzanov *et al.* (2001), as celulasas, lipases, pectinases e proteases podem ser utilizadas eficientemente nos processos de limpeza de fibras de algodão. Nos últimos anos, as enzimas hidrolíticas vêm sendo mais utilizadas nos processos industriais, sendo aplicadas na degradação de várias substâncias naturais (Oliveira *et al.*, 2006). De forma geral, elas são usadas em grande escala nas indústrias têxteis (amilase, celulase, pectinase, oxidorreductase), de detergentes (celulase, lipase, protease, oxidorreductase), alimentícia (celulase, lactase, lipase, pectinase, protease, oxidorreductase), de papel (lipase, oxidorreductase, xilanase), e de couro (lipase e protease) (Kirk *et al.*, 2002; Nielsen e Oxenbøll, 1998).

As enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde os tempos antigos na produção de produtos alimentícios, tais como queijo, fermento, cerveja, vinho, vinagre e na fabricação de produtos, tais como couro e linho. Entretanto, a produção industrial de enzimas é o resultado de um desenvolvimento rápido, principalmente nas últimas quatro décadas, graças à evolução da biotecnologia moderna (Kirk *et al.*, 2002). Portanto, existem muitas enzimas produzidas por micro-organismos que são potencialmente utilizadas no processo industrial devido às suas características específicas (Carmelo *et al.*, 2002; Godfrey e West, 1996; Wiseman, 1985).

2.2. CARACTERÍSTICAS DOS MICRO-ORGANISMOS TERMOFÍLICOS E SUAS ENZIMAS

O crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por micror-organismos termofílicos é motivado por sua capacidade de atuar em condições em que as enzimas produzidas por micro-organismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (Ferrer *et al.*, 2007; Hough e Danson, 1999).

Micro-organismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados micro-organismos termofílicos ou termófilos e são classificados em: termófilos moderados, em que a faixa de temperatura de crescimento está entre 20°C e 55°C; termófilos extremos, cujo crescimento se dá em temperaturas de 65°C a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando crescem entre 85°C até 110°C. Os micro-organismos termófilos moderados podem ser encontrados nos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (fungos filamentosos); os micro-organismos termófilos extremos são encontrados nos domínios *Bacteria* e *Archaea*; e os hipertermófilos apenas são encontrados no domínio *Archaea* (Madigan e Oren, 1999).

A adaptação de um determinado micro-organismo à termofilia envolve adaptação da membrana citoplasmática, do DNA e das proteínas às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação à termofilia tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses micro-organismos podem constituir modelos interessantes para a bioengenharia ou, ainda, considerando o uso direto das mesmas em bioprocessos (Gomes *et al.*, 2007).

Existe uma estreita relação entre o nicho ocupado por um micro-organismo e as características de suas enzimas intra e extracelulares. Espera-se que micro-organismos termófilos produzam enzimas extracelulares capazes de tolerar uma temperatura correspondente, no mínimo, àquela ótima para seu crescimento. Estudos com enzimas de termófilos têm mostrado que essa relação é verdadeira, estimulando o isolamento de novas linhagens termófilas, assim como a caracterização das enzimas produzidas e o entendimento dos fatores que levam à sua termo-estabilidade (Gomes *et al.*, 2007; Egorova e Antranikian, 2005).

A busca por essas enzimas baseia-se no fato de que a utilização de uma

temperatura mais elevada em um processo industrial faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando da utilização de uma menor quantidade de enzimas, já que a cada aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de, aproximadamente, duas vezes na velocidade de reação. Além disso, a utilização de temperaturas maiores do que 60°C inibe o crescimento de microorganismos contaminantes, reduzindo a possibilidade de contaminação microbiana, o que favorece sua utilização em indústrias de alimentos (Zamost *et al.*, 1991; Wiseman, 1985).

As diferenças entre as membranas de termófilos e de mesófilos consistem, principalmente, na substituição de ácidos graxos insaturados por ácidos graxos saturados, de modo que a membrana adquira um equilíbrio entre densidade e fluidez, necessário para a manutenção de sua integridade física e funcional em temperaturas elevadas. Os ácidos graxos saturados geram ambiente mais fortemente hidrofóbico que os insaturados, auxiliando na estabilidade da membrana em altas temperaturas (Haki e Rakshit, 2003).

A manutenção da estrutura do DNA é um fator imprescindível para a estabilidade de organismos termófilos, principalmente dos hipertermófilos. No citoplasma desses últimos, tem sido detectada grande quantidade de 2,3-difosfoglicerato cíclico de potássio, cuja função é impedir danos químicos na molécula de DNA, como a perda de purina que pode ocorrer em altas temperaturas (Fields, 2001). Ainda, todos os hipertermófilos produzem uma única forma diferenciada de DNA topoisomerase chamada DNA Girase Reversa, a qual introduz superenovelamentos positivos no DNA, em contraste com os superenovelamentos negativos gerados pela DNA Girase convencional. O superenovelamento positivo promove maior resistência do DNA à desnaturação térmica (Haki e Rakshit, 2003; Stetter, 1999). Sequências codificantes de termófilos possuem altos teores de purinas, principalmente adenina (A), sugerindo que esse nucleotídeo exerce função adaptativa de estabilização da estrutura do RNA (Singer e Hickey, 2003).

Dentre os fatores que afetam a estabilidade e cinética das proteínas, o calor é o que mais promove modificações das mesmas, dentro do contexto biológico. Enzimas estáveis em temperaturas elevadas são chamadas termozimas e hipertermozimas (Gomes *et al.*, 2007).

As proteínas de micro-organismos termófilos apresentam sequências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas. Algumas diferenças na composição de aminoácidos, nos mecanismos de manutenção do enovelamento e da estabilização da estrutura foram constatadas entre enzimas de mesófilos e termófilos, porém, os fatores de pressão seletiva (pressão, pH e temperatura) e as variações filogenéticas devem ser considerados (Niehaus *et al.*, 1999). Evidências sugerem que organismos hipertermófilos foram as primeiras formas de vida na terra, e suas proteínas podem, portanto, servir como modelo para o entendimento da evolução das enzimas sob os pontos de vista biológico, químico e físico-químico (Gomes *et al.*, 2007).

A proteína nativa é mantida por um delicado balanço de forças não covalentes, como ligações de hidrogênio, pareamento de íons, interações hidrofóbicas e força de van der Waals. Com o aumento da temperatura, essas interações são rompidas e a proteína se desdobra. Algumas proteínas recuperam sua conformação ativa após o resfriamento, porém, para a maioria, a desnaturação é irreversível (Gomes *et al.*, 2007).

A estrutura espacial das proteínas é determinada por forças eletrostáticas entre grupos polares e ionizados e por efeitos hidrofóbicos envolvendo resíduos apolares (Jaenicke e Bohm, 1998). O efeito hidrofóbico é o principal mecanismo de termoestabilidade intrínseca da proteína e direciona o enovelamento, que resulta na estrutura nativa da molécula e diminui sua tendência ao desdobraimento, tornando a molécula menos flexível e menos exposta à degradação por altas temperaturas, além da diminuição da exposição de aminoácidos termolábeis (Egorova e Antranikian, 2005). A maioria das termoenzimas descritas apresenta altos teores de aminoácidos hidrofóbicos e com resíduos aromáticos. Os aminoácidos mais hidrofóbicos são Isoleucina (Ile), Valina (Val), Leucina (Leu), Fenilalanina (Phe), Cisteína (Cys) e Metionina (Met). Tanto a integridade dos aminoácidos formadores da proteína, quanto a formação do núcleo hidrofóbico são essenciais para a sua viabilidade (Jaenicke e Bohm, 1998).

A elevada rigidez intrínseca da proteína termofílica, decorrente da estabilidade do enovelamento, requer alta temperatura para atividade (maior que 40°C) a fim de promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade

essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína às temperaturas extremas parece ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (Shiraki *et al.*, 2001). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (Gomes *et al.*, 2007).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação industrial, visto que processos biotecnológicos conduzidos em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por micro-organismos mesófilos significativamente reduzidos (Haki e Rakshit, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e Antranikian, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima para atuação (Zamost *et al.*, 1991).

Apesar das vantagens que as enzimas termofílicas oferecem para o uso rotineiro na indústria, a aplicação biotecnológica de micro-organismos termofílicos tem sido muito limitada até o momento. As razões para essa contradição são muitas, mas a principal delas está relacionada com o número escasso de linhagens termofílicas para a pesquisa de enzimas termoestáveis específicas, disponíveis em coleções de culturas (Aquino, 2000).

As enzimas industriais são utilizadas como beneficiadoras e suas utilizações dependem do valor que agregam ao produto final. Apenas raramente, como ocorre no caso dos detergentes, o consumidor compra e utiliza as enzimas diretamente (Nascimento, 2004).

Desta forma, a descoberta de micro-organismos termofílicos abriu novas oportunidades para descoberta de enzimas, que apresentam atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais nos quais essa condição é necessária (Hough e Danson, 1999). As enzimas termofílicas têm se mostrado tolerantes a desnaturantes como detergentes e solventes orgânicos, sendo, então, de interesse em síntese orgânica (Atomi, 2005).

2.3. APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE ENZIMAS MICROBIANAS

O papel das enzimas é conhecido em muitos processos, e através dos tempos, com o desenvolvimento de novas técnicas, como a purificação de enzimas, vem aumentando seu número de aplicações. Além disso, com a disponibilidade das enzimas termoestáveis um número de novas possibilidades para processos industriais tem emergido (Haki e Rakshit, 2003).

Presentes em todos os sistemas biológicos, as enzimas são produzidas por todos os organismos vivos e têm a capacidade de atuar fora do meio celular. De acordo com Gacesa e Hubble (1990) e Wiseman (1985), as enzimas extracelulares possuem uma série de vantagens sobre as intracelulares. Por serem secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular, que são difíceis de aplicação em larga escala. Além disso, o número de enzimas secretadas é limitado, sendo relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento e, por fim, as enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares.

As enzimas constituem o principal alvo da pesquisa em biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Sena *et al.*, 2006; Do Canto e Menezes, 1995).

Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão óbvias que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando um mercado de aproximadamente U\$ 2,3 bilhões (Mussato *et al.*, 2007). As enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% desse montante (Merheb *et al.*, 2007), sendo que 40% deste valor são de fontes microbianas (Gupta *et al.*, 2002a; Gupta *et al.*, 2002b) e cerca de 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes (Hadj-Ali, 2007). As amilases vêm logo em seguida movimentando 30% deste mercado (Van der Maarel *et al.*, 2002). Em relação ao mercado brasileiro, este é ainda pouco representativo, correspondendo a cerca de 2% do total mundial (Mussato *et al.*, 2007). Os maiores consumidores são as indústrias de detergentes, alimentos e rações, papel e celulose, química fina e fármacos, seguidas pela indústria têxtil e de manufatura de couros (Pszczola, 2001).

Embora, tradicionalmente, as enzimas mais estudadas sejam de origem

animal ou vegetal, as enzimas microbianas apresentam alto interesse do ponto de vista da sua aplicação industrial por serem mais facilmente produzidas em larga escala via fermentação, por serem mais facilmente expressas (clonagem) em micro-organismos de cultivo já estabelecido e pela enorme diversidade microbiana existente, que oferece infinitas possibilidades de modos de ação, nas mais diversas condições. Um bom exemplo disso é a produção de enzimas termorresistentes por micro-organismos extremófilos (Haki e Rakshit, 2003). A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertence ao grupo das hidrolases (Oliveira *et al.*, 2006), dentre as quais se destacam as proteases e amilases (Ghorbel *et al.*, 2003).

2.4. PROTEASES

Proteases são enzimas envolvidas na conversão de proteínas em aminoácidos e peptídeos. A sua produção é uma propriedade pertencente a todos os organismos e são geralmente constitutivas, embora com o tempo, passam a ser parcialmente induzidas (Beg *et al.*, 2002). Kumar e Takagi (1999) citam as proteases como sendo constituintes essenciais em todas as formas de vida na terra, incluindo os procariotos, os fungos, as plantas e os animais.

As proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases e endopeptidases ou proteinases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídios ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as carboxipeptidases foram subdivididas em serina, metalo, e cisteína-carboxipeptidases e as endopeptidases são ainda classificadas em quatro relevantes grupos, que são: serina, cisteína, aspártico e metalo proteases. Sendo que as serina peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metaloproteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (Rao *et al.*, 1998).

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes indústrias em todo o mundo (Rao *et al.*, 1998). As proteases alcalinas têm sido intensamente estudadas devido à possibilidade de uso em diversos ramos industriais tais como nas indústrias de alimentos, farmacêutica, couro, detergente, diagnósticos, manejo de resíduos e de recuperação de prata usada em filmes de raio X (Genckal e Tari, 2006).

Os micro-organismos contribuem com dois terços da produção de proteases comercializadas no mundo. Existe uma longa lista de micro-organismos produtores de proteases, porém um pequeno número é explorado comercialmente devido ao fato de alguns possuírem características tóxicas e patogênicas. Um grande número de Bactérias, fungos e leveduras são conhecidos por produzir proteases alcalinas do tipo serina (Ladeira, 2009; Kumar e Takagi, 1999; Moon e Parulekar, 1992). Porém, poucos micro-organismos foram reconhecidos como produtores comerciais, sendo somente os micro-organismos que produzem quantidades substanciais de enzimas extracelulares os de maior importância industrial (Gupta *et al.*, 2002a; Gupta *et al.*, 2002b). Pesquisas conclusivas encontradas na literatura mostram que o gênero *Bacillus sp.* é significativamente a maior fonte comercial de proteases. Esse fato deve-se a uma relativa facilidade de isolamento dos micro-organismos desse gênero em diversas fontes, fazendo deles um foco de atenção na biotecnologia (Johnevelsy e Naik, 2001).

Uma grande quantidade de espécies de *Bacillus* de ambientes exóticos foi explorada para a produção de proteases, podem ser citados como produtores potenciais *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquifaciens* e *B. mojanensis* (Gupta *et al.*, 2002a; Gupta *et al.*, 2002b; Kumar e Takagi, 1999; Rao *et al.*, 1998). Sendo assim, o gênero *Bacillus* contém um grande número de espécies industrialmente importantes e fornece, aproximadamente, a metade da produção comercial atual de enzimas.

2.5. AMILASES

As amilases, tanto nos eucariotos como nos procariotos, atuam como uma das principais enzimas responsáveis pela obtenção de energia para as funções metabólicas, a partir do amido como fonte de carbono. Porém, na maioria dos eucariotos, essas enzimas atuam em tecidos ou órgãos específicos,

relacionados à nutrição do organismo, o que inviabiliza, na maioria dos casos, a sua extração e purificação para o uso comercial (Joo e Chang, 2005). Assim, os micro-organismos surgem como uma alternativa simples e barata para a produção dessas enzimas, uma vez que requerem condições mínimas de nutrição e de manutenção, apresentam alta eficiência na produção, além de secretarem estas enzimas para o meio extracelular (Sajedi *et al.*, 2005).

Uma grande variedade de micro-organismos produz um ou mais tipos de amilases, e sabe-se que as amilases produzidas por micro-organismos termofílicos apresentam características mais termoestáveis do que as produzidas pelos micro-organismos mesofílicos. Essas amilases termoestáveis são de grande interesse na indústria de processamento do amido, uma vez que a temperatura de gelatinização do mesmo situa-se próximo de 70°C (Goyal *et al.*, 2005; Sarikaya, *et al.*, 2000).

As amilases microbianas são enzimas de natureza extracelular, uma vez que o amido, o substrato das amilases, possui alta massa molecular não podendo passar através da membrana da célula. Assim, as amilases são produzidas dentro da célula e posteriormente secretadas para o meio. Entretanto, para que o micro-organismo acelere a síntese dessas enzimas, a célula recebe um sinal por meio de fragmentos de baixo peso molecular, formados pela ação de pequenas quantidades de enzimas produzidas constitutivamente (Nielsen e Borchert, 2000).

As amilases são amplamente distribuídas na natureza e, além de serem as responsáveis pela reciclagem do carbono contido nos amiláceos em geral, exercem um importante papel na indústria de processamento de amido (Kiran e Chandra, 2008). Um dos processos que utiliza as amilases é o de conversão do amido em dextrinas, maltose, glicose e frutose. As dextrinas são utilizadas em formulações clínicas, como material para a sacarificação enzimática, estabilizadores, espessantes, etc. A maltose é usada em confeitarias, refrigerantes, cervejaria, fermentações para produção de etanol, fabricação de geléias e sorvetes. A glicose é usada em refrigerantes, na panificação, cervejarias e fermentações para produção de etanol e a frutose é usada em refrigerantes, geléias, iogurtes e frutas enlatadas (Konsula e Liakopoulou-Kyriakides, 2004).

2.6. APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE ENZIMAS

A economia brasileira é uma das mais importantes do mundo baseadas na agricultura, produzindo e exportando café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas entre outros (Ladeira, 2009). Entretanto, o processamento da matéria-prima desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos, que quando acumulados promove a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (Uenojo e Pastore, 2006). Portanto, nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, etc. (Pandey *et al.*, 2000; Pandey *et al.*, 1999; Pandey e Soccol, 1998).

Na busca de soluções alternativas para o problema do descarte dos resíduos, muitas indústrias têm optado pelo uso de micro-organismos como agentes redutores de matéria orgânica ou para a eliminação ou redução de compostos tóxicos, sendo as enzimas termofílicas de grande aplicação nesses processos (Andrade *et al.*, 1999; Tavares *et al.*, 1998).

A aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos, por um lado fornece substratos alternativos e, por outro, ajuda a solucionar os problemas de poluição que sua disposição no meio ambiente poderia causar. Com o advento de inovações biotecnológicas, principalmente na área de tecnologia de enzimas e fermentações, muitos caminhos novos têm sido abertos para sua utilização (Pandey *et al.*, 2000).

Vários resíduos agroindustriais são usados como fontes alternativas de substratos para a produção de enzimas, devido à disponibilidade local e por representar uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando o objetivo é a produção destas enzimas em larga escala (Hernández *et al.*, 2006).

Aproximadamente 40% dos custos de produção de enzimas por fermentação correspondem ao meio de cultivo. O uso de meios de cultura alternativos para produção de proteases por *Bacillus* tem sido relatado em muitos trabalhos científicos (Ladeira, 2009). Esses meios podem ser obtidos a partir de

várias fontes tais como casca em pó de camarão e caranguejo (Yang *et al.*, 2000), farinha de peixe (Ellouz *et al.*, 2001), farelo de soja (Joo e Chang, 2005; Joo *et al.*, 2002), farinha de sementes de amaranto (Pastor *et al.*, 2001), penas de frango (Gessesse *et al.*, 2003), araruta (Kumar e Parrack, 2003), soro de queijo e água de maçeração de milho (Ladeira *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2008a; Carvalho *et al.*, 2008b; Silva *et al.*, 2007; Nascimento *et al.*, 2007).

2.7. SORO DE QUEIJO

A porção aquosa do leite, que se separa do coágulo, durante a fabricação convencional de queijos, é o soro de queijo; um fluido opaco e amarelo-esverdeado, que retém cerca de 55% dos nutrientes do leite (Nicolau *et al.*, 2004; Kosikowski, 1979). Aproximadamente 85-95% do volume de leite usado na fabricação de queijos resulta em soro, que contém cerca de metade dos sólidos totais do leite, representados por proteínas hidrossolúveis, principalmente albuminas e globulinas, sais, gordura e lactose (Nicolau *et al.*, 2004), sendo encontrados nas seguintes proporções: 6,0-6,5% de sólidos totais, sendo cerca de 4,5-5,0% de lactose, 0,8-1,1% de proteína, 0,03-0,1% de gordura, 0,5-0,8% de matéria mineral e 0,2-0,8% de ácido láctico (Revellion *et al.*, 2000; Moresi, 1994).

Em termos de volume e em função das técnicas utilizadas na produção, pode-se produzir entre nove a doze litros de soro, com média de dez litros para cada quilo de queijo produzido (Giroto e Pawlowsky, 2001; Richards, 1997; Sottiez, 1985).

Historicamente o soro de queijo foi considerado um produto residual de baixo valor econômico. Seu grande volume de obtenção representa um dos maiores problemas para a indústria de laticínios. Em toda a extensão territorial brasileira, a maioria dos pequenos e médios produtores de queijo não consegue dar um destino nobre ao soro de leite, havendo uma enorme deficiência de tecnologias que viabilizem o aproveitamento de suas proteínas. Por conter elevada quantidade de nutrientes, é considerado um material altamente poluente, com a demanda biológica de oxigênio (DBO) de 30.000 a 50.000 mL⁻¹ (Borges *et al.*, 2001). Desta forma, com a tendência de obter processos limpos e ambientalmente corretos na produção de alimentos, tem sido crescente a preocupação de encontrar aplicações econômicas para o soro obtido da produção

de queijo (Capitani *et al.*, 2005).

O soro lácteo possui alto valor funcional e nutritivo e, devidamente processado, seja como concentrado ou isolado proteico, constitui-se em um excelente ingrediente para a fabricação de vários alimentos industrializados. Uma quantidade substancial de soro de leite é descartada anualmente no Brasil, na forma de resíduo industrial, causando um grave problema ambiental (Yoshida e Antunes, 2009).

A descarga de soro, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável diante de suas características nutricionais. Sendo que o soro é uma importante fonte de proteínas e lactose a um baixo custo que poderia ser melhor aproveitada gerando empregos diretos e indiretos, aumentando a renda dos empresários do ramo e criando maior circulação de capitais, além de diminuir os custos com tratamentos de efluentes e danos ambientais (Fornari, 2006; Oliveira, 2006). Além disso, segundo Richards (2002), descartar soro sem tratamento eficiente não é só um crime ambiental, mas é também rejeitar um ingrediente que possui alta qualidade.

No Brasil, os dados sobre a disponibilidade do soro de leite são altamente imprecisos, mas boa parte do queijo é produzida por pequenas empresas, que evitando o custo do tratamento deste efluente e sem fiscalização efetiva das autoridades, optam pela utilização parcial deste subproduto como alimentação animal, descartando o excedente diretamente nos rios (Silva e Bolini, 2006; Antunes, 2003).

A composição do soro de queijo confere várias aplicabilidades nas indústrias alimentícias, porém ainda não é totalmente explorado no país. Há a necessidade de maior incentivo de aproveitamento do soro em função do valor nutricional, enorme volume de produção devido à plena expansão das queijarias, além de gerar benefícios com a redução do volume de resíduos a ser tratado por essas indústrias (Viotto e Machado, 2007).

Em alguns países desenvolvidos, o aproveitamento do soro lácteo chega a 100% do volume produzido. Entretanto, de acordo com pesquisas do “*Programa Minas Leite*” da Secretaria da Agricultura do Estado de Minas Gerais (Estadão de São Paulo, 2007), o Brasil busca aumentar o processamento do soro, para atender a demanda interna de soro em pó, nas indústrias de bebidas lácteas, panificação, biscoitos, fármacos e rações, e conseqüentemente, diminuir a sua

necessidade de importação do produto. Assim, a produção de soro em pó pode ser considerada uma alternativa econômica, geradora de emprego e também uma fonte de renda ao produtor (Bieger e Lima, 2008).

O descarte do soro, além de trazer danos à natureza, corresponde também a um desperdício inaceitável devido à apreciável quantidade de proteínas, lactose, e demais compostos, tornando-se assim muito atrativo além de economicamente viável para processos fermentativos, onde poderá ser utilizado principalmente como fonte de carbono de baixo custo (Mesomo, 2007).

O reaproveitamento de resíduos é uma alternativa de gerenciamento para as agroindústrias, e no caso do soro, gera resultados de vulto. Considerando o grande volume de soro produzido pelos laticínios, o custo para um tratamento que possibilite o seu descarte no meio ambiente se torna muito alto. Por outro lado, com o advento de novas tecnologias para secagem do soro, é possível aproveitar os seus componentes principais, ou seja, a lactose e as proteínas solúveis, e assim transformar um custo em geração de renda por meio da produção de insumos para outros ramos industriais (Bieger e Lima, 2008).

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de queijo como substrato para o cultivo de micro-organismos foi realizada por diversos pesquisadores (Romero *et al.*, 2001; Feijoo *et al.*, 1999; Kosikowski, 1979) e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato. Portanto, devido à sua rica composição, o soro de queijo é um substrato em potencial para a produção industrial de proteases microbianas. Desta forma, vários estudos têm sido desenvolvidos com a utilização de soro lácteo para produção de enzimas hidrolíticas com intuito de viabilizar a produção destas enzimas (Ladeira *et al.*, 2010; Nascimento *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007).

Atualmente, a legislação ambiental vem se tornando cada vez mais rígida e conseqüentemente, as indústrias de laticínios procuram alternativas para aproveitamento do soro resultante da produção de queijo (Barbosa *et al.*, 2010). Dentre as várias técnicas de aproveitamento do soro do queijo destaca-se como substrato para fermentação, sendo também matéria-prima bastante interessante na fabricação de diversos produtos como etanol (Taherzadeh e Karimi, 2008; Yang e Silva, 1995), extrato de levedura (Révillion *et al.*, 2000), ácido láctico (Skory, 2004; Shreve e Brink, 1977), bebidas lácteas (Capitani *et al.*, 2005), entre outros.

Devido à sua rica composição o soro de leite é um ótimo substrato para a fermentação industrial e tem contribuído para bom crescimento microbiano (Lee *et al.*, 2003).

2.8. FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ

O Brasil é o principal produtor mundial de maracujá (*Passiflora edulis Sims*), com produção de aproximadamente 172,3 mil toneladas por ano (Oliveira *et al.*, 2002). Cerca de 90% das cascas e sementes de maracujá das indústrias de sucos e polpas são descartadas, embora apresentem grande quantidade de fibras, pectina e óleo, sendo o restante aproveitado para diversos fins como, por exemplo, na preparação de ração animal e na fabricação de doce (Oliveira *et al.*, 2002).

O maracujá é uma fruta bastante consumida no mundo e no Brasil, sua polpa contém ácido ascórbico e carotenóides (Talcoot *et al.*, 2003), sua casca contém pectina (21,5%), triptofano, ácidos graxos e aminoácidos (Guertzenstein e Srur, 2002). Em relação aos subprodutos da indústria de sucos, o principal é a casca do fruto, para a qual foi demonstrado grande potencial de substâncias em sua composição, especialmente fibras solúveis (Córdova *et al.*, 2005; Ichimura *et al.*, 2006).

A casca do maracujá, que representa 52% da composição da massa do fruto já não pode ser considerada um resíduo industrial, uma vez que suas características e propriedades funcionais podem ser usadas para o desenvolvimento de novos produtos (Pinheiro *et al.*, 2008; Ishimoto *et al.*, 2007; Souza e Sandi, 2001; Medina, 1980). Devido à produção significativa de suco de maracujá, as cascas, tornam-se um problema ambiental. Por isso, torna-se necessário encontrar uma forma viável para transformar as cascas em produtos úteis ou para eliminá-los adequadamente, buscando um impacto ambiental positivo (Pinheiro *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006).

Farinha da casca de maracujá é um subproduto das fábricas de suco. É muito utilizada para produção de ração animal e descartada como resíduo industrial. Considerando-se que na fabricação de pectina pela indústria de alimentos, a casca é toda extraída (Kliemann *et al.*, 2009), um aproveitamento racional e eficiente desse resíduo como substrato para a produção de proteínas

microbianas poderá gerar resultados satisfatórios na produção em escala industrial (Araújo *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2002), contribuindo também para minimizar os problemas de perdas na industrialização do maracujá (Oliveira *et al.*, 2006).

3. TRABALHOS

3.1. UTILIZAÇÃO DE SORO DE QUEIJO E FARINHA DA CASCA DE MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE PROTEASE PELO TERMOFÍLICO *Bacillus sp.*

UTILIZATION OF CHEESE WHEY AND FLOUR PASSION FRUIT PEEL AS
CULTURE MEDIUM FOR PRODUCTION OF PROTEASE BY A THERMOPHILIC
Bacillus sp.

João Batista Barbosa, Natiele Oliveira Gentil, Silvania Alves Ladeira, Andréia
Boechat Delatorre, Érika Fraga de Souza, Meire Lelis Leal Martins*

*Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP: 28015-602, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, Telefone: (22) 2739-7129, Fax: (22) 2739-7194, E-mail: meire@uenf.br

RESUMO

Enzimas proteolíticas constituem o grupo mais importante de enzimas comerciais produzidas. *Bacillus sp.* SMIA-2 produziu protease quando cultivado em solução (0,5% p/v) de soro de queijo em pó (SQP) e farinha da casca de maracujá (0,25% p/v) e atingiu um máximo em 72 horas, com níveis de 11,40 U/mL. Estudos sobre a caracterização da protease demonstraram que a temperatura ótima desta enzima foi de 70°C. Em relação a termostabilidade, a protease manteve 70% da atividade original após 30 minutos de incubação a 60°C e a 70°C, 65% da atividade original foi mantida após 15 minutos. O pH ótimo da enzima foi de 9,0, sendo esta estável em pH entre 6,0 e 9,0 e maior estabilidade foi observada em pH 8,5 e 9,0.

Palavras-chave: Protease, soro de queijo, farinha de maracujá, *Bacillus sp.*

ABSTRACT

The proteolytic enzymes are the most important group of commercially produced enzymes. *Bacillus sp.* SMIA-2 produced protease when cultivated in cheese whey powder (CWP) solutions (0.5%, w/v) supplemented with flour passion fruit peel (0.25%, w/v) and reached a maximum at 72 h, with levels of 11.40 U/mL. Studies on the protease characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 70°C. Thermostability profile indicated that the enzyme retained 70% of the original activity after 30 min of heat treatment at 60°C. At 70°C, 65% of the original activity was retained after 15 min of heat treatment. The optimum pH of the enzyme was found to be 9.0. The enzyme was stable between pH 6.0 and 9.0 and higher stability was observed at pH 8.5 and 9.0.

Key-words: Protease, cheese whey, passion fruit flour peel, *Bacillus sp.*

3.1.1. INTRODUÇÃO

A maioria das enzimas industriais utilizadas atualmente pertence ao grupo das hidrolases, que são ativas em vários substratos naturais. Os microorganismos constituem a principal fonte destas enzimas, as quais foram identificadas após uma extensa pesquisa, e atualmente são utilizadas em várias

aplicações industriais (Carvalho *et al.*, 2008a; Carvalho *et al.*, 2008b; Silva *et al.*, 2007; Mitidieri *et al.*, 2006; Bon, 1995).

O gênero *Bacillus sp.* contém um grande número de espécies industrialmente importantes que são responsáveis por, aproximadamente, metade da produção comercial de enzimas (Zhang e Kim, 2010; Aguilar *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007; Beg e Gupta, 2003; Singh *et al.*, 2001; Sookkheo *et al.*, 2000; Kumar *et al.*, 1999; Ferrero *et al.*, 1996; Sinha e Satyanarayana, 1991).

Estes micro-organismos podem ser cultivados sob condições extremas de temperatura e pH dando origem a produtos que são estáveis em uma ampla faixa de ambientes hostis (Silva *et al.*, 2007; Nascimento e Martins, 2006; Johnvesly *et al.*, 2002; Han e Damodaran, 1997). Além disso, são capazes de utilizar substâncias orgânicas consistindo de misturas complexas típicas de resíduos e apresentam uma variedade de sistemas de enzimas hidrolíticas (Ghorbel *et al.*, 2003). Com exceção do grupo *Bacillus cereus* (que inclui *Bacillus anthracis*), são saprófitas inofensivos, que não produzem toxinas e são incluídos no grupo de organismos geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (Silva *et al.*, 2007; Mahmood *et al.*, 1998).

As proteases constituem um dos grupos mais importantes de enzimas industriais com aplicações em diferentes indústrias em todo mundo, representando, aproximadamente, 60% do total de enzimas comercializadas (Vishwanatha e Rao, 2010), sendo as bactérias do gênero *Bacillus sp.* a maior fonte comercial destas enzimas usadas atualmente (Cheng *et al.*, 2010; Akhtar *et al.*, 2008; Schallmey *et al.*, 2004). *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus pumilis* são as espécies mais usadas na indústria para a produção de proteases (Sabir e El-Bestawy, 2009; Guangrong *et al.*, 2008; Adans e Kelly, 1998).

Atualmente, o custo total de produção de enzimas microbianas é muito elevado, devido ao alto custo dos substratos e dos meios utilizados. Devido a isso, esforços têm sido direcionados para explorar meios alternativos para reduzir os custos de produção das proteases por meio da melhoria da produtividade, bem como a utilização de substratos de baixo custo como os subprodutos agrícolas na composição dos meios (Kuberan *et al.*, 2010).

Soro de queijo (SQ) é um produto obtido do processo de fabricação do queijo, cujos principais componentes são lactose (44-52 g/L), proteínas (6-8 g/L) e sais minerais (4-9 g/L). Devido à sua rica composição, o soro de leite é um ótimo

substrato para a produção de vários compostos industrialmente importantes, como as enzimas microbianas (Romero *et al.*, 2001; Feijoo *et al.*, 1999; Kosikowski, 1979).

Um outro tipo de resíduo comum no Brasil são as cascas e sementes de maracujá geradas com a produção de suco. A casca, que representa 52% da composição da massa do fruto não pode ser considerada um resíduo industrial, uma vez que suas características e propriedades funcionais podem ser usadas para o desenvolvimento de novos produtos (Pinheiro *et al.*, 2008; Ishimoto *et al.*, 2007; Souza e Sandi, 2001; Medina, 1980). Devido à produção significativa de suco, as cascas do maracujá, tornaram-se um problema ambiental. Portanto, torna-se necessário buscar uma forma viável para transformar as cascas em produtos úteis ou para eliminá-los adequadamente, buscando um impacto ambiental positivo (Pinheiro *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2006).

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar a utilização de soro de queijo em pó e da farinha da casca de maracujá para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2. Além disso, algumas características importantes da enzima como a estabilidade à temperatura e ao pH foram determinadas.

3.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste estudo foi o *Bacillus sp.* SMIA-2, uma bactéria termofílica isolada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), a partir de amostras de solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ (Souza e Martins, 2001). Os resultados da comparação das seqüências de rRNA16S indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *Bacillus caldoxylyticus* e *Bacillus sp.* espécie AK1 (Souza e Martins, 2001). O micro-organismo foi conservado em ágar TSY (triptona 20 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹; ágar 20 g.L⁻¹ e água 1 L), em placa de Petri a 4°C.

3.1.2.2. Preparação do meio de cultura e condições de fermentação

O meio de cultura base utilizado neste trabalho para a produção de proteases foi soro de queijo doce, fornecido pela empresa Alibra Ingredientes Ltda com a seguinte composição (g/100g): Carboidratos – 74, proteínas - 11, gorduras totais - 1,5 e minerais - 2,8. O meio de cultivo mencionado foi preparado utilizando água destilada como diluente e em seguida foi submetido à esterilização em autoclave. O pH final foi ajustado para 7,0-7,5 com NaOH 0,5 M antes da esterilização.

Uma vez preparado o meio de cultura, este foi inoculado com 1 mL de pré-inóculo preparado no dia anterior. Os experimentos foram realizados em triplicata, em frascos erlenmeyers de 250 mL, contendo 25 mL do meio, usando o shaker (Thermo Forma, Ohio, EUA) a 150 rpm e à temperatura de 50°C/24 horas. Amostras em triplicata foram retiradas em intervalos regulares e analisadas para medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a Densidade ótica (DO) através de espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini -1240 (Kyoto, Japão), pH e atividade da protease.

3.1.2.3. Preparo do pré-inóculo

O pré-inóculo foi preparado estriando o micro-organismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células, que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 25mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas a 50°C e posteriormente utilizadas para inocular o meio de produção.

3.1.2.4. Efeito da composição do meio de cultura na produção da enzima

A fim de determinar a melhor concentração do SQP para o crescimento e a atividade da protease a concentração no meio (descrito no item 3.1.2.2) variou de 0,25% a 1,5%. O efeito da suplementação do meio com diferentes resíduos

agroindustriais (0,5% p/v) como farelo de aveia, farinha de arroz, sabugo de milho, farinha de milho e farinha da casca do maracujá sobre o crescimento e a atividade da enzima também foi investigado. Os resíduos foram obtidos a partir do mercado local, com exceção da farinha da casca do maracujá, que foi fornecida pelo Setor de Engenharia do Frio em Alimentos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Oliveira, 2009).

3.1.2.5. Ensaio enzimático

Alíquotas do meio de cultura foram centrifugadas a 4.500 g por 15 minutos a 4°C (HERMLE Z382K) e o sobrenadante livre de células foi utilizado para dosagem da atividade da enzima. A atividade de proteases foi determinada em triplicata nos filtrados da cultura, adicionando-se 0,5 mL do extrato enzimático bruto em 1 mL de substrato contendo azocaseína 0,2% dissolvida em tampão Tris-HCL 0,2 M (pH 8,5) a 70°C por 10 minutos. A reação foi paralisada com a adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético 15% à mistura que foi, em seguida centrifugada a 15.000g por 5 minutos a 4°C (HERMLE Z382K). O sobrenadante foi transferido para tubo de ensaio contendo 0,5 mL de solução de NaOH 1 M. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento da absorvância a 420 nm igual a 0.1 em 60 minutos (Janssen *et al.*, 1994).

A coloração desenvolvida foi medida por meio de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 420 nm. O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade de protease foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir um aumento na absorbância, a 420 nm, igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen *et al.*, 1994).

3.1.2.6. Efeito do pH sobre a atividade de proteases e estabilidade

O pH ótimo para a atividade da protease foi determinado com azocaseína 0,2% (p/v) como substrato, dissolvido em diferentes tampões (citrato de sódio, pH 5,0-5,5, fosfato de sódio, pH 6,0-8,0, Tris-HCl, pH 8,5-9,0 e bórax, pH 9,5-10,0). O

efeito do pH na estabilidade da enzima foi determinado incubando-se o extrato enzimático bruto nos tampões anteriormente descritos, sem o substrato, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da protease foi determinada a 70°C conforme descrito no item 3.1.2.5.

3.1.2.7. Efeito da temperatura sobre a atividade proteolítica e estabilidade

O efeito da temperatura sobre a atividade enzimática foi determinada incubando-se a mistura da reação em temperaturas que variaram de 40-100°C por 10 minutos em pH 9,0. Após 10 minutos de reação em cada temperatura a atividade enzimática foi determinada conforme descrito no item 3.1.2.5. A termoestabilidade foi determinada pela incubação do extrato enzimático bruto a temperaturas que variam de 40-100°C por 0, 15, 30 e 60 minutos em banho-maria à temperatura constante. Após este tratamento, a atividade proteolítica residual foi analisada à temperatura ótima da enzima determinada anteriormente.

3.1.2.8. Análises Estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GENES (Cruz, 2006). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes concentrações de SQP foram testadas para determinar seu efeito na produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2. A concentração inicial do SQP tem uma grande influência sobre a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 (Figura 1).

A concentração do SQP de 0,5% foi aquela que promoveu a máxima atividade da protease quando a população celular atingir seu pico (Figura 1). Entretanto, em concentrações maiores foi observado um declínio na atividade de proteases e no crescimento do micro-organismo.

A utilização do soro de queijo como meio de cultura para a produção de proteases microbianas foi relatada previamente em *Bacillus subtilis* NRRL 3411 (Massuco *et al.*, 1978), *Bacillus sp.* (Dias *et al.*, 2008) e *Serratia marcescens* (Ustáriz *et al.*, 2008).

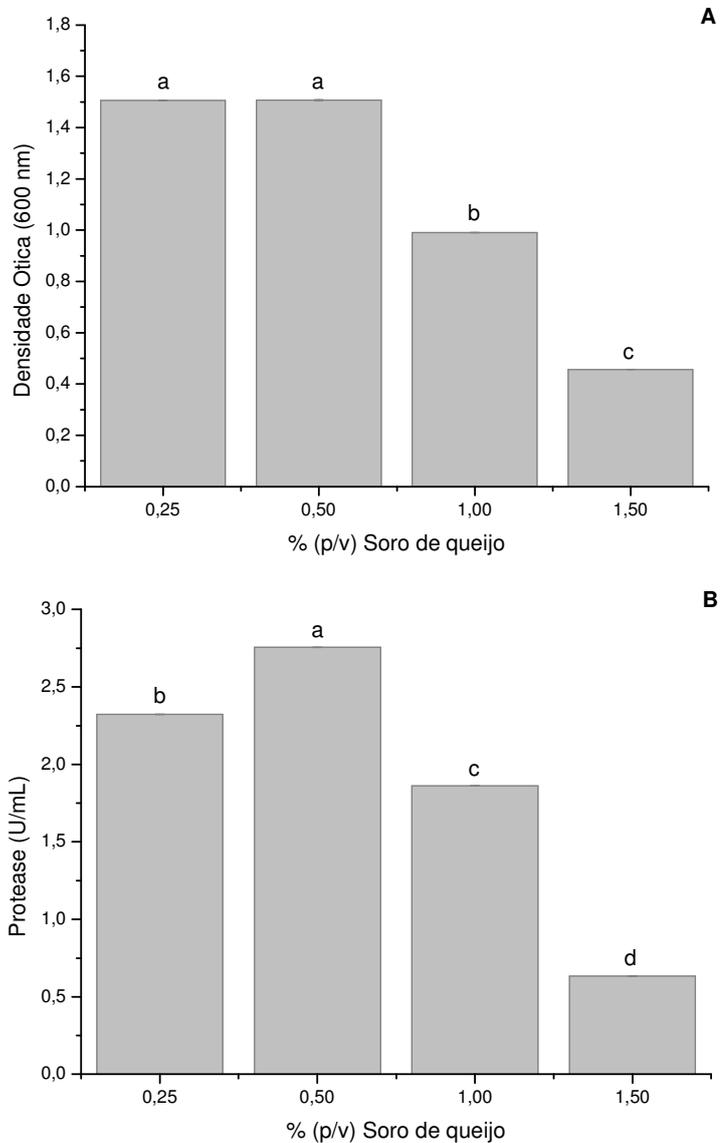
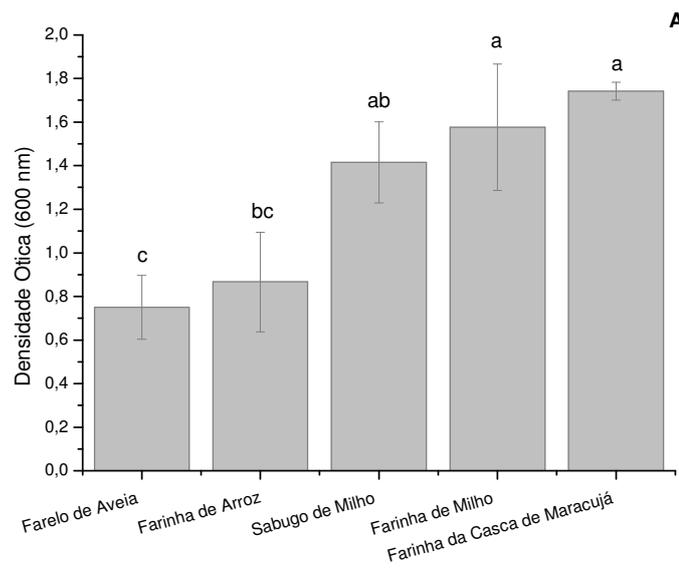


Figura 1: Crescimento (A) e atividade da protease (B) de *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado em diferentes concentrações de soro de queijo em pó a 50°C por 48 horas.

De um modo geral não existe um meio definido para a produção de proteases para diferentes estirpes microbianas (Ladeira *et al.*, 2010; Oskouie, *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2006). Uma vez que cada micro-organismo tem seu próprio

requerimento físico e nutricional para a produção de proteases. Considerando a grande importância comercial destas enzimas, a elaboração de um meio com nutrientes de baixo custo torna-se uma preocupação primária (Reddy *et al.*, 2008; Chauhan e Gupta, 2004).

Como *Bacillus sp.* SMIA-2 apresentou baixa atividade de protease quando cultivado apenas nas soluções do SQP em relação a resultados anteriormente obtidos para este micro-organismo (Silva, 2006; Nascimento, 2004), foi explorada a possibilidade de utilizar outros resíduos como co-substratos. Uma melhoria significativa na atividade de proteases (4,5 vezes) por *Bacillus sp.* SMIA-2 foi obtida quando o meio de cultura base (0,5% p/v de SQP), foi suplementado com (0,5% p/v) farelo de aveia, farinha de milho e farinha de casca de maracujá, embora a densidade de ótica diminuísse quando o farelo de aveia e farinha de arroz foram utilizados como co-substratos (Figura 2).



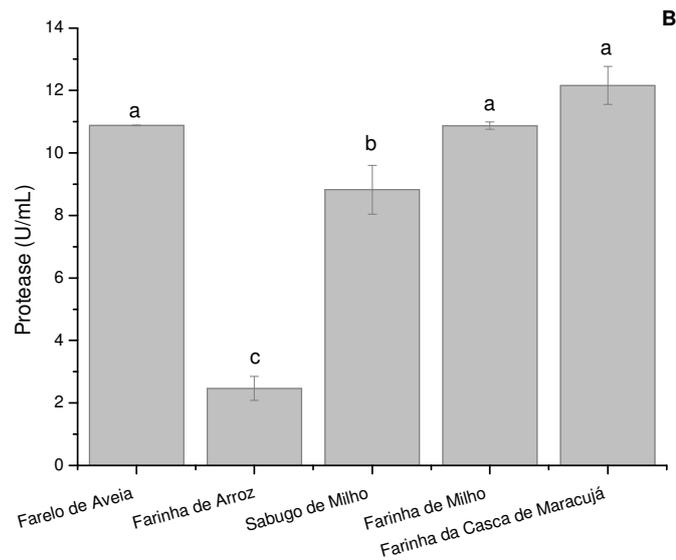


Figura 2: Crescimento (A) e atividade da protease (B) de *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado em soro de queijo (0,5% p/v) e diferentes co-substratos a 50°C por 48 horas.

Como a suplementação do meio (SQP 0,5%, p/v) com farinha da casca de maracujá, promoveu maior atividade da protease e permitiu uma melhor repetibilidade nos experimentos de produção da enzima. Por isso, este resíduo foi selecionado para os experimentos posteriores como um componente do meio de cultura. A fim de determinar melhor concentração deste resíduo, diferentes concentrações (0,15%, 0,25% e 0,5% p/v) foram utilizadas em combinação com soro de queijo (0,5%, p/v) e comparadas em relação à atividade de protease. Embora o crescimento do micro-organismo tenha sido maior em 0,5% (p/v) de farinha da casca de maracujá, os maiores níveis de atividade enzimática foram detectados em culturas cultivadas em 0,25% (p/v) (Figura 3). Logo, o meio contendo 0,5% (p/v) de soro de queijo e 0,25% (p/v) de farinha da casca de maracujá foi considerado o mais eficaz para a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2.

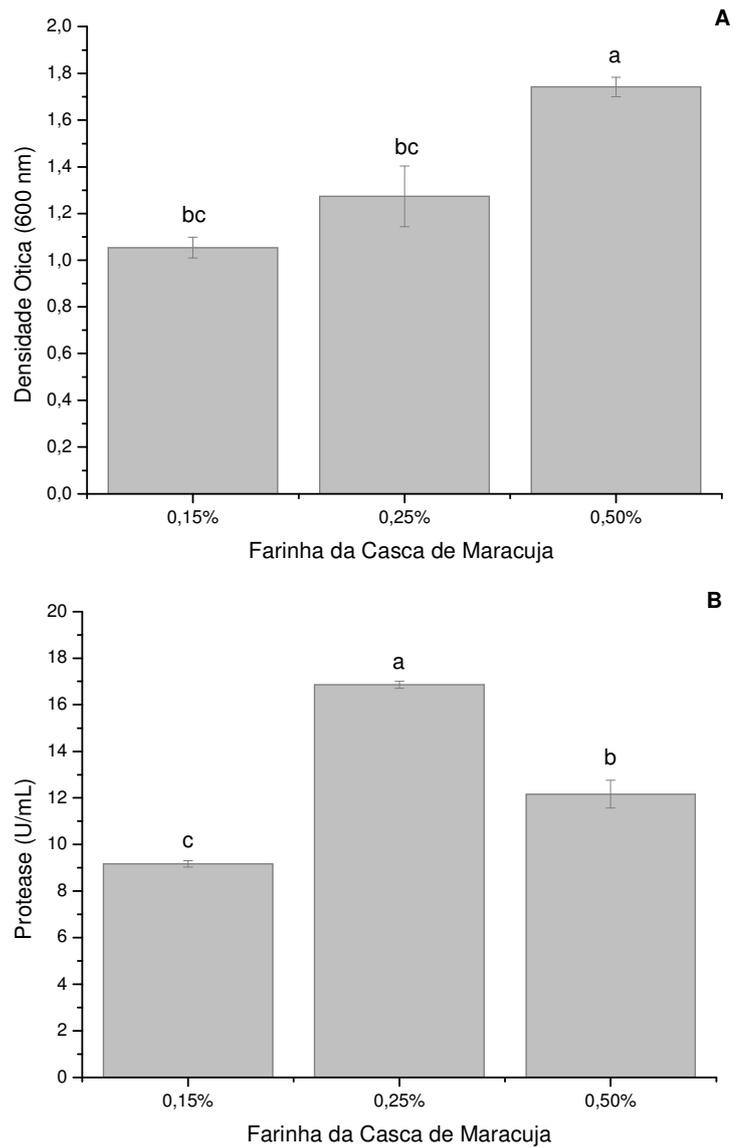


Figura 3: Efeito da concentração de farinha da casca do maracujá sobre o crescimento (A) e atividade da protease (B) de *Bacillus sp. SMIA-2* cultivado em 0,5% p/v de soro de queijo a 50°C por 48 horas.

O perfil do crescimento de *Bacillus sp. SMI-2* e da atividade de protease foi observado por 96 horas no meio de cultura contendo 0,5% p/v de soro de queijo e 0,25% p/v de farinha da casca de maracujá em frascos erlenmeyers de 250 mL (Figura 4).

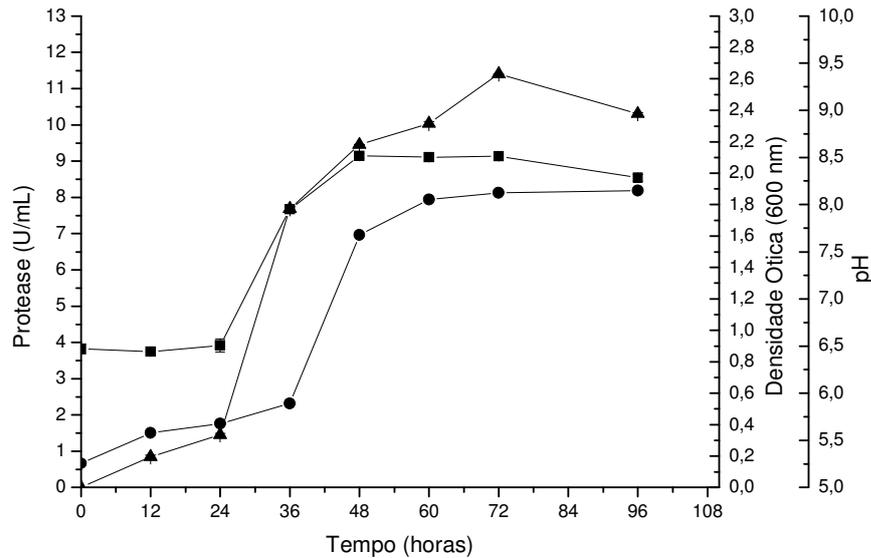


Figura 4: Crescimento (●), atividade de protease (▲) e alteração do pH do meio (■) em função do tempo de cultivo de *Bacillus sp.* SMIA-2 em soro de queijo 0,5% (p/v) e 0,25% (p/v) de farinha da casca de maracujá a 50°C.

Bacillus sp. SMIA-2 apresentou máxima atividade da protease após 72 horas de incubação, quando a cultura se encontrava na fase estacionária do crescimento celular. A produção de proteases extracelulares durante a fase estacionária de crescimento é uma característica de muitas espécies bacterianas (Bhaskar *et al.*, 2007). Sendo assim, os resultados obtidos neste estudo confirmam as pesquisas realizadas até o momento. Geralmente, a síntese e secreção de proteases é iniciada durante a fase exponencial de crescimento, com um aumento substancial perto do final desta fase de crescimento e alcança a produção máxima na fase estacionária de crescimento (Bhaskar *et al.*, 2007).

O pH do meio de cultivo aumentou após 24 horas de incubação da cultura atingindo 8,5 em 48h e então quase não variou com o decorrer do crescimento. Segundo Ming Chu (1992), a acidificação ou alcalinização do meio de cultura reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino. A atividade máxima da enzima foi sinalizada por uma diminuição da variação do pH. Assim, o perfil do pH do meio de cultura fornece informações úteis sobre o processo de produção de proteases, como o início e o final de sua síntese.

Os efeitos da temperatura sobre a atividade da protease usando azocaseína como substrato foram examinados a temperaturas variando entre 40°C-100°C em um pH constante de 9,0. A atividade da enzima aumentou com a elevação da temperatura atingindo seu valor máximo a 70°C e a redução da atividade da enzima foi observada em valores acima de 70°C (Figura 5A). A temperatura ideal da protease de 70°C foi maior ou semelhante ao descrito para outras proteases de *Bacillus* (Johnvesly e Naike, 2001; Barnerjee *et al.*, 1999; Horikoshi, 1990; Manachini *et al.*, 1988). A estabilidade térmica da protease foi examinada pela medida das atividades residuais a 70°C, após a incubação da enzima sem substrato em várias temperaturas entre 60-90°C por 1 hora (Figura 5b).

O perfil da termoestabilidade indicou que a enzima manteve 70% da atividade máxima após 30 minutos de tratamento térmico a 60°C. A 70°C, 65% da atividade máxima foi mantida após 15 minutos. A protease de *Bacillus licheniformis* NH1 foi rapidamente inativada a 70°C perdendo 56% da atividade inicial após 10 minutos de incubação na presença de CaCl₂, enquanto que nenhuma atividade foi detectada na ausência de aditivos (Hadj-Ali *et al.*, 2007). Além disso, a protease de *Bacillus licheniformis* SMI 4.C.1. reteu 60% da atividade original após 30 minutos de tratamento térmico a 70°C (Manachini *et al.*, 1988).

O interesse por enzimas termoestáveis produzidas especialmente por micro-organismos termofílicos e hipertermofílicos, que crescem na faixa de temperatura entre 45 e 110°C, tem crescido a cada dia. Esta estabilidade é considerada como a preservação da estrutura tridimensional sobre diferentes condições físicas ou químicas. (Nascimento, 2005; Scandurra *et al.*, 1998).

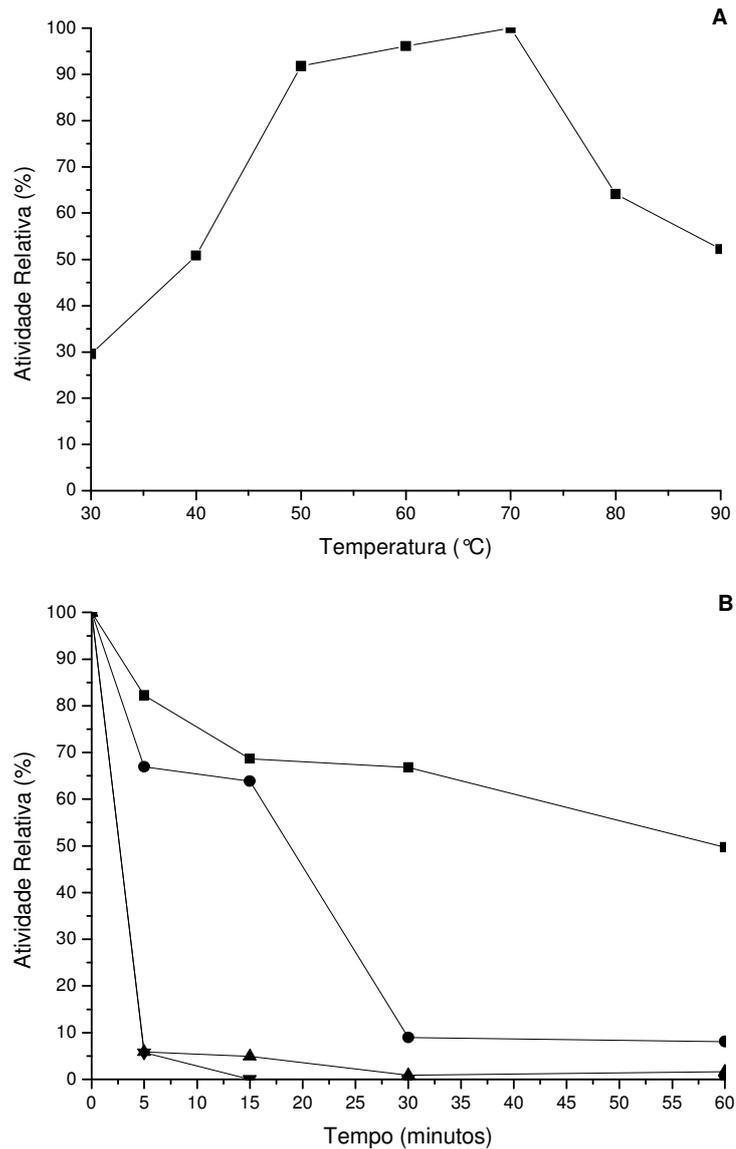


Figura 5: Temperatura ótima (A) e estabilidade térmica (B) da protease secretada por *Bacillus sp.* SMIA-2 quando cultivado a 50°C por 72 horas sob temperaturas de 60°C (■), 70°C (●), 80°C (▲) e 90°C (▼). 100% da atividade da enzima = 10,84 U/mL.

Os efeitos do pH sobre a atividade da protease foram examinados em diversos valores de pH a 70°C, sendo o pH ótimo da enzima 9,0 (Figura 6A). A atividade da protease em pH 7,0 e pH 8,5 foi 79,7% e 97,5% em relação ao encontrado em pH 9,0, respectivamente. A atividade da protease diminuiu significativamente acima de valores de pH 9,5 e foi 75% e 55,5% da atividade máxima da enzima em pH 9,5 e 10,0, respectivamente (Figura 6A).

Conforme mostrado na Figura 6B, a enzima foi estável em valores de pH entre 6,0 e 10,0 e maior estabilidade foi observada em pH 8,5 a 9,0. Resultados semelhantes são reportados por Phadattare *et al.* (1993) na avaliação de uma protease alcalina de *Conidiobolus coronatus*, onde esta enzima mostrou alta estabilidade em pH acima de 8,5.

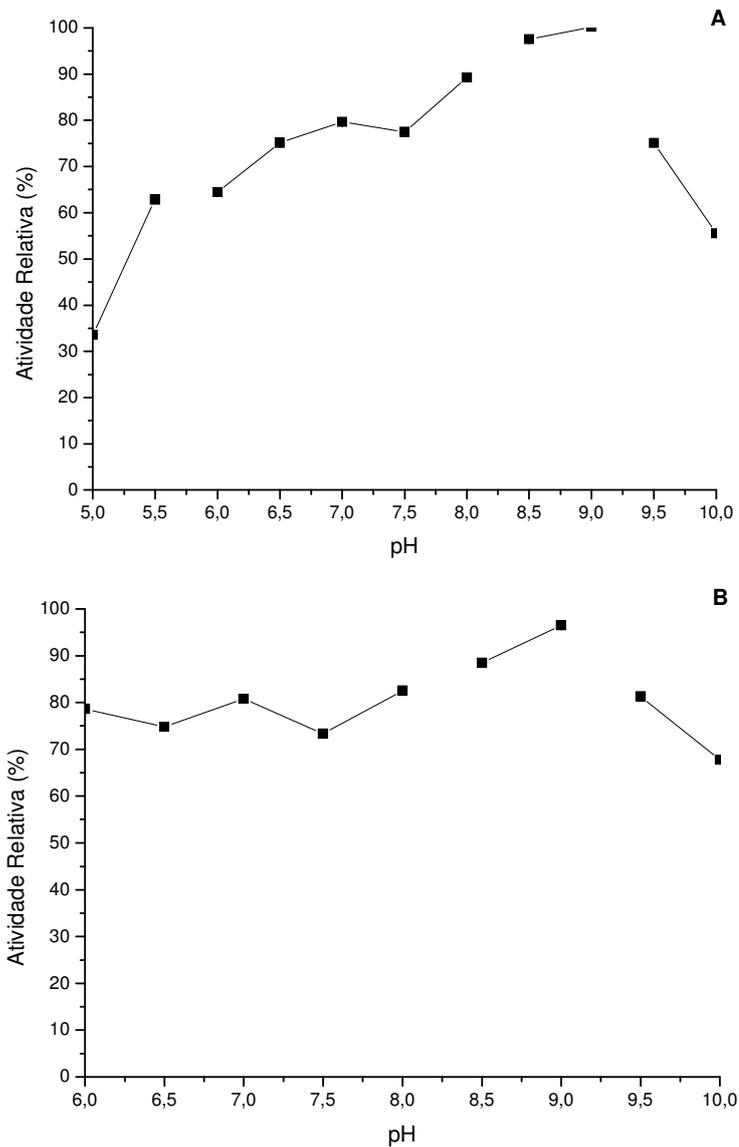


Figura 6: pH ótimo (A) e estabilidade (B) da protease secretada por *Bacillus sp.* SMIA-2 quando cultivado a 50°C por 72 horas. 100% da atividade da enzima = 10,23 U/mL

3.1.4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, pode se concluir que o soro de queijo e a farinha da casca de maracujá podem ser utilizadas como substratos para o crescimento e a produção de proteases extracelulares por *Bacillus sp.* SMIA-2. As características apresentadas pela enzima como pH e temperatura ótima de 9,0 e 70° C e alta estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, permitem sua utilização em diversos ramos industriais, dentre eles em formulações de detergentes.

3.1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adans, M., Kelly, R. (1998) Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol.* 16, 239-332.
- Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J.L., Contreras-Esquivel, J.C. (2008) Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 4(4): 354-366.
- Akhtar, N., Ghauri, M.A., Iqbal, A., Anwar, M.A., Akhtar, K. (2008) Biodiversity and phylogenetic analysis of culturable bacteria Indigenous to khewra salt mine of pakistan and their industrial importance. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39:143-150.
- Barnerjee, U.C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry.* 35:213-219.
- Beg, Q.K., Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microbial. Technol.* 32, 294-304.
- Bhaskar, E., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., Selvi, A.T. (2007) Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology.* 98:2758-2764.
- Bon, E.P.S. (1995) A tecnologia enzimática no Brasil, *Enzitec.* 95, 9-14.
- Carvalho, R.V., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, n.1, p.1-7.
- Carvalho, R.V., Córrea, T.L.R.C., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology.* 39:102-107.
- Chauhan, B., Gupta, R. (2004) Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* RGR-14. *Process Biochem.* 39, 2115–2122.
- Cheng, K., Lu, F.P., Li, M., Liu, L.L., Lian, X.M. (2010) Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 9(31), pp. 4942-4953.

- Cruz, Cosme Damião. *Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes*. 1^a. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 1, 285p.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. (2008) Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol Biotechnol.* 24:2027–2034.
- Feijoo, G., Moreira, M.T., Roca, E., Lema, J.M. (1999) Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera sp.* BOS55. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v. 23, n. 1, p. 86-90.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Singeriz, F. (1996) Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 327-332.
- Ghorbel, B., Kamoun, A.S., Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology.* 32:513-518.
- Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, H., Jiaxin, J. (2008) Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus sp.* HS08 with a statistical method. *African Journal of Biotechnology.* Vol. 7 (8), pp. 1115-1122.
- Hadj-Ali, N.E., Agrebi, R., Ghobel-Frikha, B., Sellami-Kamoun, A., Kanoun, S., Nasri, M. (2007) Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and microbial Technology.* 40:515-523.
- Han, X.Q., Damodaran, S. (1997) Isolation, identification and fermentation of a *Bacillus sp.* producing a detergent-stable endopeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4191-4195.
- Horikoshi, K. (1990) Enzymes of alkalophilies. In: *Microbial Enzyme and Biotechnology.* 2nd, 275-94.
- Ishimoto, F.Y., Harada, A.I., Branco, I.G., Conceição, W.A.S., Coutinho, M.R. (2007) Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. *Revista Ciências Exatas e Naturais.* Vol. 9, nº2.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994) Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus sp.*Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 400-406.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.* JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochem.* 37, 139-144.
- Kosikowski, F.V. (1979) Our Industry Today. *J. Dairy Sci.*, v. 62, n. 7, p. 1149-1160.

- Kuberan, T., Sangaralingam, S., Arasu, S.T. (2010) Isolation and optimization of Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *J. Biosci. Res.*, Vol. 1(3):163-174.
- Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D. (1999) Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus spp.*: Purification and some properties. *Process Biochem.* 34, 441-449.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) 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. *Revista Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish, T.A.G. (2006) Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chem. Eng. J.* 120, 203-209.
- Mahmood, A.U., Greenman, J., Scragg, A.H. (1998) Orange and potato pell extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial. Technol.* 22, 130-137.
- Manachini, P.L., Fortina, M.G., Parini, C. (1988) Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol.* 28, 409-413.
- Massucco, A.E., Mazza, L.A., Balatti, A.P. (1978) Production of alkaline protease from acid cheese whey. *Rev. Assoc. Argent Microbiol.* 10(1):14-19.
- Medina, J.C. Subprodutos. In Medina, J. C. et al. (1980) *Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas: Inst Tecnol. Alim., p.145-148.
- Ming Chu, I., Lee, C., Li, T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, n. 4, p. 755-761.
- Mitidieri, S., Martinelli, A.H.S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2006) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology.* 97: 1217–1224.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:307-311.
- Nascimento, W.C.A. (2004) Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.

- Oliveira, E.M.S. (2009) *Avaliação do processo de separação e purificação dos resíduos do maracujá-amarelo para obtenção de farinha da casca e pectina*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 146p.
- Oskouie, S.F.G., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Eftekhari, F. (2008) Response surface Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.* 39, 37-42.
- Phadatare, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme Microb Technol.* 15:72-76.
- Pinheiro, E.S., Silva, I.M., Gonzaga, L.V., Amante, E.R., Teofilo, R.F., Ferreira, M.M., Amboni, R.D. (2008) Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology.* 99:5561-5566.
- Rao, Y.K., Lu, S.C., Liu, B.L., Tzeng, Y.M. (2006) Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochem. Eng. J.* 28, 57, 2006.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y., Yun, J., Ryu, H. (2008) Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology.* 99:2242-2258.
- Romero, F.J., García, L.A., Salas, J.A., Díaz, M., Quiró, M. (2001) Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochem.*, v. 36, n. 6, p. 507-515.
- Sabir, J.S.M., El-Bestawy, E. (2009) Enhancement of alkaline protease production in *Bacillus circulans* using plasmid transformation. *World J Microbiol Biotechnol.* 25:2021–2027.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P.C. (1998) Protein Thermostability in Extremophiles. *Biochimie.* 80: 933-941.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol.* 50, 1-17.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus sp.* and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology.* 38:253-258.
- Silva, C.R. (2006) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 66p.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, C.R. (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochem.* 36, 781-785, 2001.

- Sinha, N., Satyanarayana, T. (1991) Alkaline protease by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.* 31, 425-430.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. (2000) Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Prot. Exp. Pur.* 20, 142-151.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology.* 32: p. 271-275.
- Souza, A.C.G., Sandi, D. (2001) Industrialização. In: *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco continentes, p.305-343.
- Ustáriz, F.J., Laca, A., García, L.A., Díaz, M. (2008) Fermentation conditions increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia.* Vol. 31, N°1, 79-89.
- Vishwanatha, K.S., Rao, A.G. (2010) Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 37:129–138.
- Zhang, C., Kim, S.K. (2010) Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs.* 8, 1920-1934.

3.2. UTILIZAÇÃO DO SORO DE QUEIJO E DA FARINHA DA CASCA DO MARACUJÁ COMO MEIO DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE PROTEASE E α -AMILASE PELO TERMOFILICO *Bacillus sp.*

UTILIZATION OF CHEESE WHEY AND PASSION FRUIT PEEL FLOUR AS CULTURE MEDIUM FOR PRODUCTION OF PROTEASE AND α -AMYLASE BY A THERMOPHILIC *Bacillus sp.*

João Batista Barbosa, Natiele Oliveira Gentil, Andréia Boechat Delatorre, Silvania Alves Ladeira, Érika Fraga de Souza, Meire Leis Leal Martins*

*Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA), Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA), Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000, CEP: 28015-602, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, Telefone: (22) 2739-7129, Fax: (22) 2739-7194, E-mail: meire@uenf.br

RESUMO

A produção simultânea de α -amilase e proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 foi investigada em culturas em batelada contendo soro de queijo em pó e farinha da casca de maracujá. As maiores atividades de α -amilase e protease obtidas

quando o micro-organismo foi cultivado no meio contendo 0,5% (p/v) de soro de queijo e 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá foram encontradas na fase estacionária de crescimento. A suplementação do meio de cultura com metais aumentou a atividade de ambas as enzimas e a multiplicação do micro-organismo. Estudos sobre a caracterização das enzimas revelaram que as características mais importantes foram a elevada temperatura ótima para atividade da α -amilase (90°C) e da protease (70°C). A α -amilase e protease mantiveram 21,17% e 65,98% de sua atividade máxima quando incubadas a 90°C e 70°C, respectivamente, por 15 minutos. A atividade ótima da α -amilase foi encontrada em pH 8,0 enquanto a da protease em pH 9,0.

Palavras-chave: Protease, α -amilase, soro de queijo, farinha da casca de maracujá, *Bacillus sp.*

ABSTRACT

The simultaneous production of α -amylase and protease by thermophilic *Bacillus sp.* SMIA-2 was investigated in batch cultures using powder cheese whey and passion fruit peel flour. The high activities of α -amylase and proteases reached when the microorganism was cultivated in a medium containing 0.5% (w/v) powder cheese whey and 0.15% (p/v) passion fruit peel flour were found in the stationary phase. The supplementation of the culture medium with metals improved the production of both enzymes and the growth of the microorganism. Studies on the protease characterization revealed that the most important kinetic properties of the enzymes were the high temperature optima of α -amylase and protease (70°C). The α -amylase and protease retained about 21.17% and 65.98% of its maximum activity when incubated at 90°C and 70°C, respectively, for 15 minutes. The optimum activity of the α -amylase was found to be in pH 9.0 while the protease in pH 8.5.

Key-words: Protease, α -amylase, cheese whey, passion fruit peel flour, *Bacillus sp.*

3.2.1. INTRODUÇÃO

As amilases e proteases estão entre as mais importantes enzimas industriais e são de grande importância comercial. Além de serem usadas como aditivos em detergentes, elas podem ser empregadas nas indústrias de alimentos, farmacêutica, papel e têxtil (Soares *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2002b).

Amilases e proteases são produzidas principalmente por bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus sp.* Este fato deve-se a uma relativa facilidade de isolamento dos micro-organismos deste gênero de fontes diversas, fazendo deles um foco de atenção na biotecnologia (Johnevelsy *et al.*, 2001).

Entre os vários parâmetros que estimulam a produção de amilases e proteases, as condições de crescimento microbiano e os substratos usados no meio de cultivo têm recebido atenção especial (Oliveira *et al.*, 2007; Haq *et al.*, 2002). Tendo em vista que o substrato para o crescimento do micro-organismo responde por 30-40% do custo da produção de enzimas em escala industrial, o estudo de alternativas a fim de baratear este processo, como a utilização de subprodutos agroindustriais de baixo custo, torna-se interessante (Joo e Chang, 2005). Além disso, a produção de mais de uma enzima em um só processo fermentativo aumenta significativamente a eficiência e a economia do processo (Corrêa, 2009). Considerando que o uso industrial de amilases e proteases é esperado aumentar na próxima década, as indústrias produtoras destas enzimas estão sempre na busca de novos e menos dispendiosos métodos para aumentar a produção destas enzimas.

O soro de queijo, um subproduto, obtido da fabricação de queijo, representa cerca de 85-95% do volume de leite e retém 55% dos nutrientes do leite, tais como: lactose (4,5-5% p/v), proteínas solúveis (0,6-0,8% p/v), lipídeos (0,4-0,5% p/v) e sais minerais (8-10% de extrato seco). Devido à sua rica composição, o soro de queijo é um ótimo substrato para a produção de enzimas microbianas (Dias *et al.*, 2008). Outro tipo de resíduo comum no Brasil são as cascas e sementes de maracujá geradas com a produção de suco. O Brasil detém o título de maior produtor e exportador do suco desta fruta e durante o processamento da mesma, as cascas e sementes correspondem de 65 a 70% da massa, o que faz com que este tipo de indústria gere toneladas de resíduos de

processo (Togashi *et al.*, 2007). Neste trabalho, foi investigada a produção simultânea de proteases e α -amilase por *Bacillus sp.* SMIA-2, utilizando como meio de cultura o soro de queijo suplementado com farinha da casca do maracujá. Além disso, investigou-se algumas propriedades das enzimas produzidas.

3.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no setor de Microbiologia Industrial e de Alimentos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

3.2.2.1. Micro-organismo e condições da cultura

O micro-organismo empregado neste estudo foi uma bactéria termofílica *Bacillus sp.* SMIA-2, isolada por Souza e Martins (2001), a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes-RJ, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). A comparação das seqüências de 16S rRNA indicou que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus sp.* AK1 (Souza e Martins, 2001).

O meio de cultura utilizado para a produção da α -amilase e protease continha (g/L): amido (batata, milho e mandioca) – 5,0 e soro de queijo em pó (g/100g: Carboidratos – 74, proteínas - 11, gorduras totais - 1,5 e minerais - 2,8) – 5,0. Este meio foi modificado substituindo o amido por farinha da casca do maracujá (0,15% e 0,25%, p/v) sozinha e juntamente com o farelo de aveia (0,15% e 0,25%, p/v). Posteriormente, os seguintes metais foram adicionados ao meio (g/L): KCl - 0,3; MgSO₄ - 0,5; k₂HPO₄ - 0,87; CaCl₂ - 0,29; ZnO - $2,03 \times 10^{-3}$; FeCl₃.6H₂O - $2,7 \times 10^{-2}$; MnCl₂.4H₂O - $1,0 \times 10^{-2}$; CuCl₂.2H₂O - $8,5 \times 10^{-4}$; CoCl₂.6H₂O - $2,4 \times 10^{-3}$; NiCl₃.6H₂O - $2,5 \times 10^{-4}$ e H₃BO₃ - $3,0 \times 10^{-4}$ (Nascimento, 2004).

O pH dos meios foi ajustado para 7,0 com NaOH 1,0M e estes meios foram esterilizados em autoclave a $121^{\circ}\text{C} \pm 2$ por 15 minutos.

O inóculo foi preparado ao se germinar o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS (modelo Q 315 D26), a 50°C. Após 18 horas de incubação, 5 mL do meio de crescimento foram adicionados em cada placa e as células removidas utilizando-se uma pipeta estéril. Estas células foram, então, inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo o respectivo meio de crescimento, com um volume de meio de 25 mL, e então, incubadas a 50°C em agitador Thermo Forma Orbital Shaker (Ohio, USA) operando a 150 rpm. Em intervalos de tempo determinados foram retirados frascos em triplicata para medida do pH e da densidade ótica a 600 nm, com a utilização de espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.2.2.2. Ensaio enzimático

Para a remoção das células, o meio de cultura foi centrifugado a 4.500g por 15 minutos à 4°C em uma centrífuga modelo HERMLEZ 382K (Wehingen, Germany) e o sobrenadante livre de células utilizado para dosagem da atividade da enzima.

3.2.2.2.1. Determinação da atividade da α -amilase

A atividade amilolítica do micro-organismo foi determinada segundo a metodologia do ácido 3,5-dinitrossalicílico ou Reagente de Miller (DNS) (Miller, 1959) que determina o incremento dos açúcares redutores na solução como resultado da ação da α -amilase sobre o amido.

A reação continha 0,5 mL do extrato enzimático, 0,5 mL da solução de amido a 0,5% preparada em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e 0,2 mL do mesmo tampão. Esta mistura foi incubada em banho-maria a 90°C por 10 minutos. Em seguida, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL da solução de DNS (Miller, 1959) à mistura. Em seguida esta mistura foi colocada em água em ebulição durante 10 minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram resfriadas em banho de gelo durante 5 minutos e adicionadas de 4,8 mL de água destilada. A coloração desenvolvida foi determinada com espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. O

mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o DNS foi adicionado antes do sobrenadante à solução de amido 0,5% e 0,2 mL de Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,5) e todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de açúcares redutores foi determinado por meio de uma curva de glicose. Uma unidade de atividade da amilase foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de açúcares redutores por minuto por mL da enzima a partir do amido solúvel.

3.2.2.2. Determinação da atividade da protease

A atividade de protease foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (p/v). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão TRIS-HCl 0,2 M (pH 8,5).

Nesta análise, uma amostra de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionada a 1 mL do substrato e, após a incubação em banho-maria a 70°C por 10 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 0,5 mL de TCA. A amostra foi então centrifugada a 15.000g durante 5 minutos a 4°C (HERMLE Z382K) e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH 1M, conforme descrito por Janssen *et al.*, (1994). O mesmo procedimento foi realizado com o controle, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 420 nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos (Janssen *et al.*, 1994).

3.2.2.3. Caracterização parcial da α -amilase e protease

3.2.2.3.1. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da α -amilase e protease

O efeito da temperatura na atividade das enzimas foi determinado incubando-se a mistura de reação em temperaturas entre 50 e 100°C, com intervalos de 10°C, em pH 8,5 para a protease e em pH 8,0 para α -amilase. Após

10 minutos de incubação em cada temperatura, a atividade enzimática foi determinada nas condições padrões descritas nos itens 3.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2.

A estabilidade térmica foi avaliada pela incubação do sobrenadante nas temperaturas de 60, 70 e 80°C para protease e 80, 90 e 100°C para α -amilase por 1 hora em banho-maria. Após a incubação, a atividade residual foi analisada nas temperaturas ótimas das enzimas e a atividade residual (%) foi obtida segundo descrito nos itens 3.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2.

3.2.2.3.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da α -amilase e protease

O efeito do pH na atividade da amilase e proteases foi avaliado na faixa de 6,0 a 10,0 com intervalos de 0,5 unidades. As soluções tamponantes utilizadas foram tampão fosfato (pH 6,0-8,0), tampão Tris-HCl (pH 8,5-9,0) e tampão Bórax (pH 9,5-10,0).

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato, amido 0,5% (p/v) e azocaseína 0,2% (p/v), nas soluções tampão com diferentes valores de pH. A partir daí, a reação foi executada conforme descrito nos itens 3.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2.

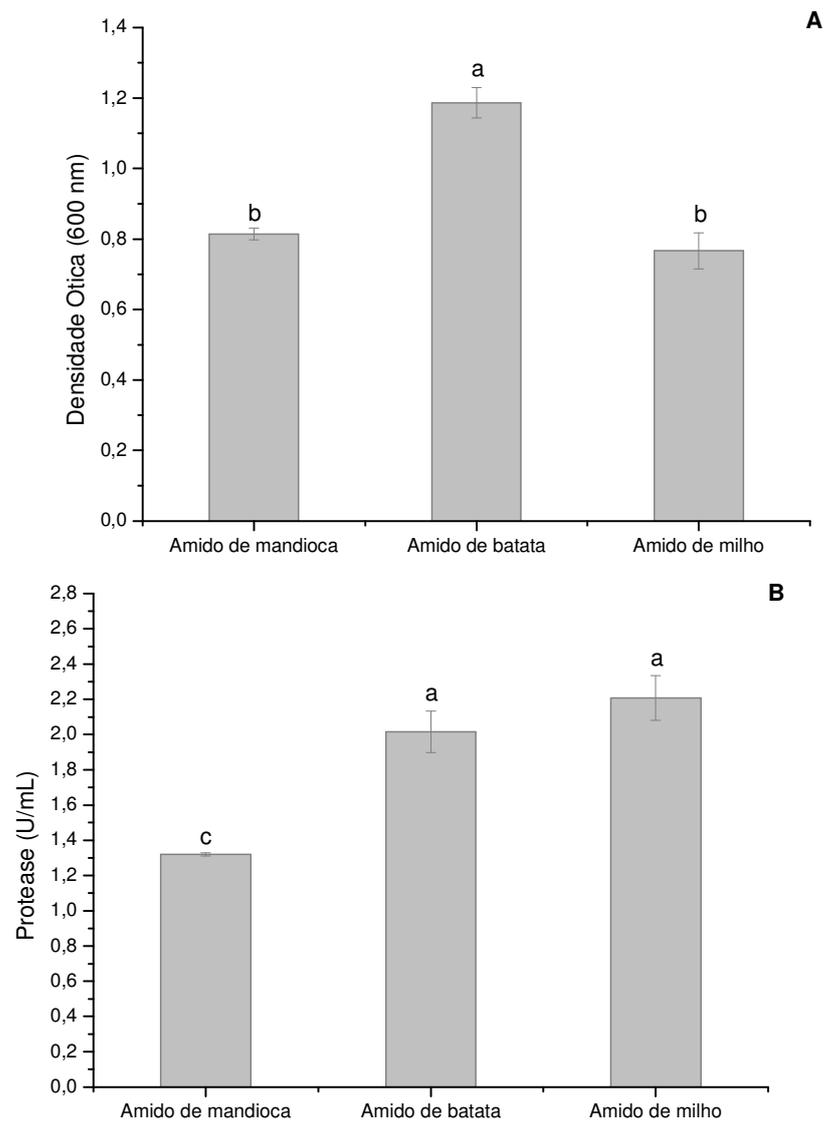
A estabilidade da enzima em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se apenas o sobrenadante nas soluções tampão descritas anteriormente por 2 horas em temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual (%) de α -amilase e proteases foi determinada conforme descrito nos itens 3.2.2.2.1. e 3.2.2.2.2.

3.2.2.4. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa GENES (Cruz, 2006). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Bacillus sp. SMIA-2 cresceu e secretou alta atividade enzimática de α -amilase quando cultivado em soro de leite em pó (0,5%, p/v) adicionado de amido (0,5%, p/v) de mandioca, batata e milho. A maior atividade desta enzima (1079,49 U/mL) foi observada quando o amido de milho foi utilizado como substrato. Por outro lado, uma baixa atividade da protease foi encontrada nestes mesmos meios (Figura 1B).



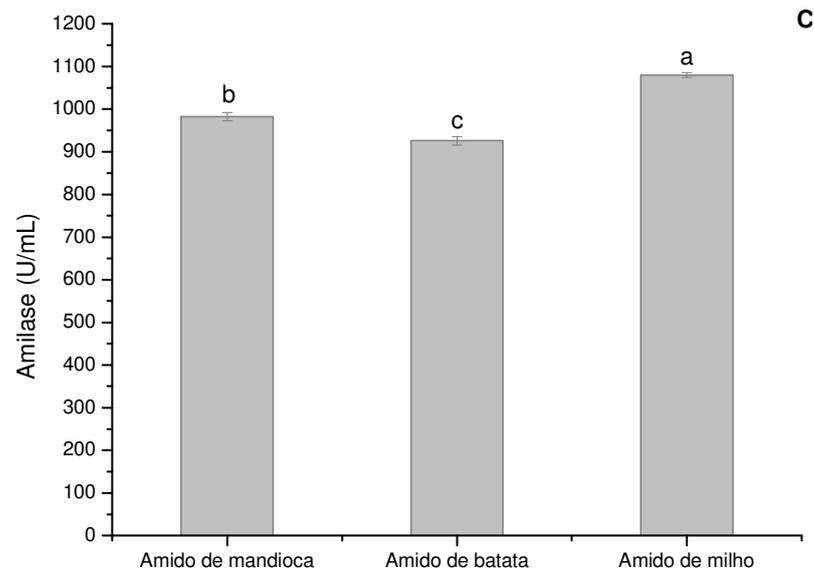


Figura 1: Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de *Bacillus sp.* SMIA-2 contendo soro de queijo (0,5%, p/v) e diferentes fontes de amido (0,5%, p/v) a 50°C e 150 rpm por 72 horas.

Amilases e proteases, como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há a necessidade de serem secretadas pelos micro-organismos, para que estes cresçam em amido e em proteínas. Assim, estes resultados eram esperados uma vez que o amido presente no meio de fermentação (0,5%, p/v) é o indutor natural da amilase. Em relação à protease, a atividade encontrada foi baixa, provavelmente, devido à baixa concentração de proteínas presentes no meio de cultura (0,055%, p/v).

A substituição do amido no meio de cultura por farinha de maracujá e farinha de maracujá acrescida de farelo de aveia (0,15% e 0,25%), promoveu um aumento da atividade da protease (Figura 2B). A maior atividade desta enzima foi encontrada quando 0,25% (p/v) de farinha de maracujá foi adicionada ao soro. Entretanto a atividade da α -amilase diminuiu para todos os meios, sendo esta redução mais pronunciada quando 0,25% (p/v) de farinha de maracujá foi adicionada ao soro (Figura 2C).

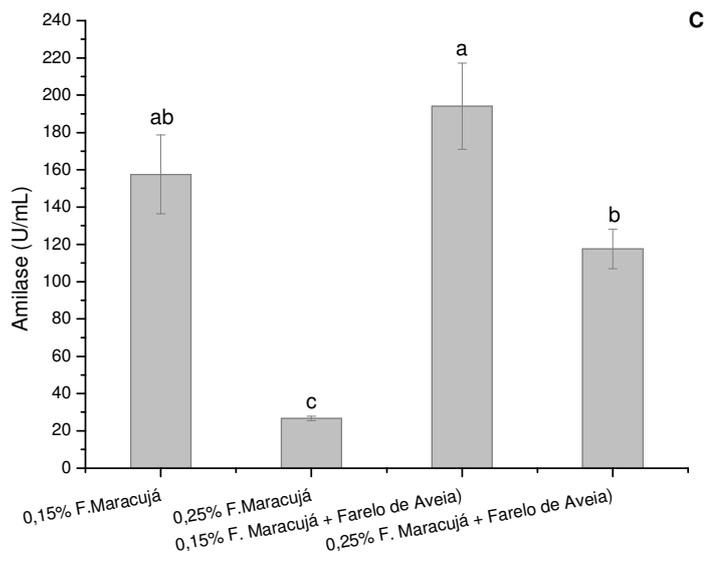
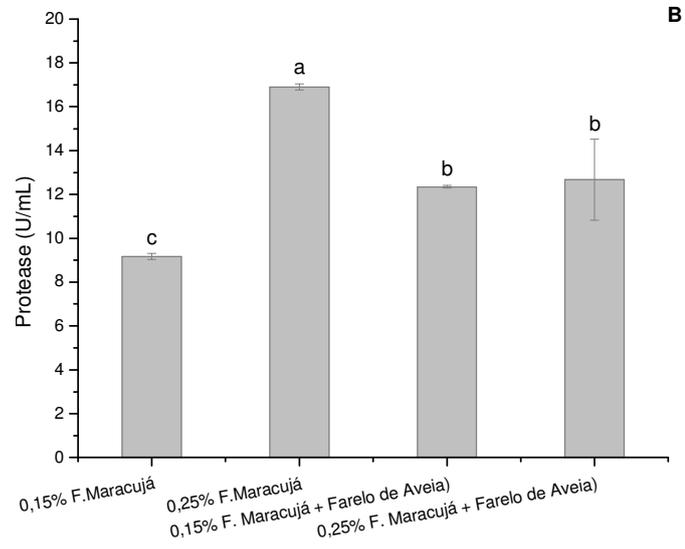
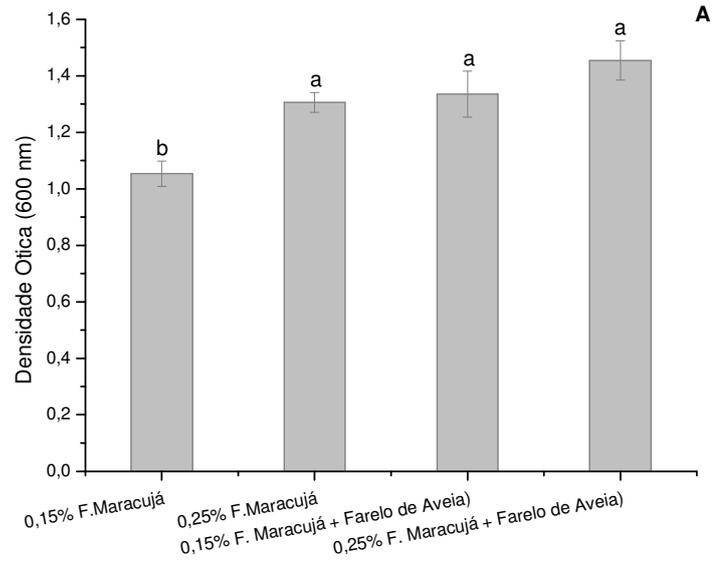


Figura 2: Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de *Bacillus sp.* SMIA-2 contendo soro de queijo (0,5%, p/v) e farinha de maracujá e/ou farelo de aveia a 50°C e 150 rpm por 72 horas.

Vários pesquisadores têm relatado a utilização de resíduos agroindustriais como substratos para a produção de proteases e amilases, visando, principalmente, a produção desta enzima em larga escala. Dias *et al.* (2008) relataram a utilização do soro de queijo em pó como um bom indutor para a síntese de proteases por *Bacillus sp.* UFLA 817CF e *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Entretanto, ao utilizar o soro de queijo como fonte de carbono para produção de uma protease alcalina por um isolado de *Bacillus sp.* L21, Tari *et al.* (2006) constataram que este resíduo proporcionou menor atividade específica da enzima. Cascas de maracujá e farelo de arroz foram utilizadas por Rodrigues *et al.* (2009), para a produção de amilases por *Aspergillus niger* cepas, ATCC 16404 e 10577. Menezes *et al.* (2006) utilizaram resíduo de maracujá como substrato para produção de protease por *Aspergillus niger*.

Considerando que a utilização de 0,5% (p/v) do soro juntamente com 0,15% (p/v) de farinha de maracujá proporcionou bons níveis de atividade tanto da protease quanto da α -amilase, estas concentrações dos subprodutos foram escolhidas para estudos de produção simultânea das enzimas.

A adição de metais ao meio soro de queijo (0,5%, p/v) suplementado com farinha de maracujá (0,15%, p/v) promoveu um aumento na multiplicação do micro-organismo e na atividade tanto de protease quanto de amilase (Figura 3). Resultados similares foram obtidos por Gupta *et al.* (2002b) e por Nascimento e Martins (2004) em que a suplementação do meio de cultura com uma solução de traços de metais aumentou a multiplicação do *Bacillus sp.* SMIA-2 e a produção de proteases. Segundo, estes autores, pequenas quantidades de elementos traços como ferro, Cobre, molibidênio e zinco são necessários para o crescimento microbiano, uma vez que participam como co-fatores essenciais para a atividade de algumas enzimas, sendo necessário em alguns casos, adicioná-los ao meio de crescimento.

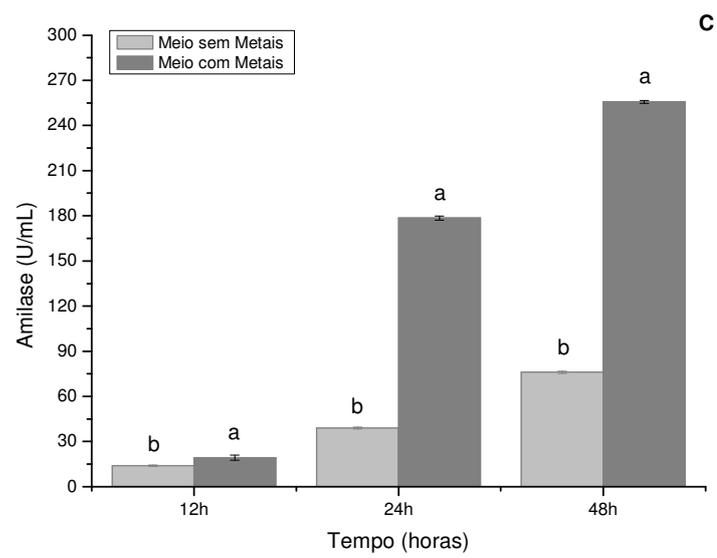
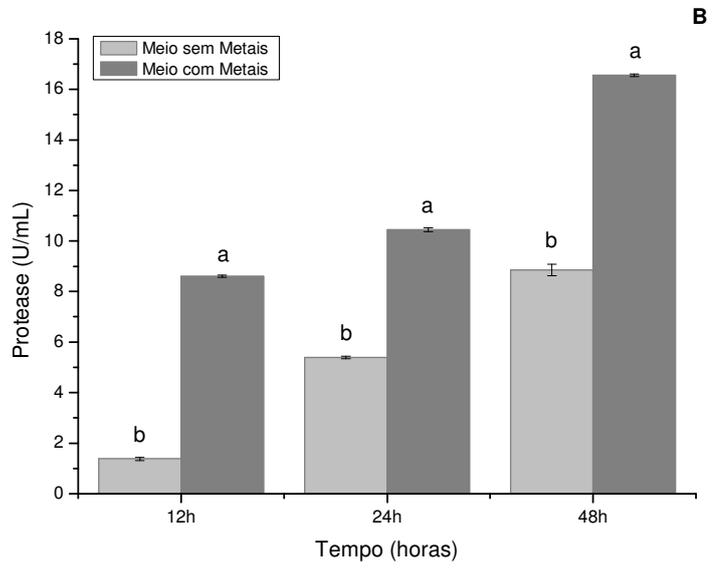
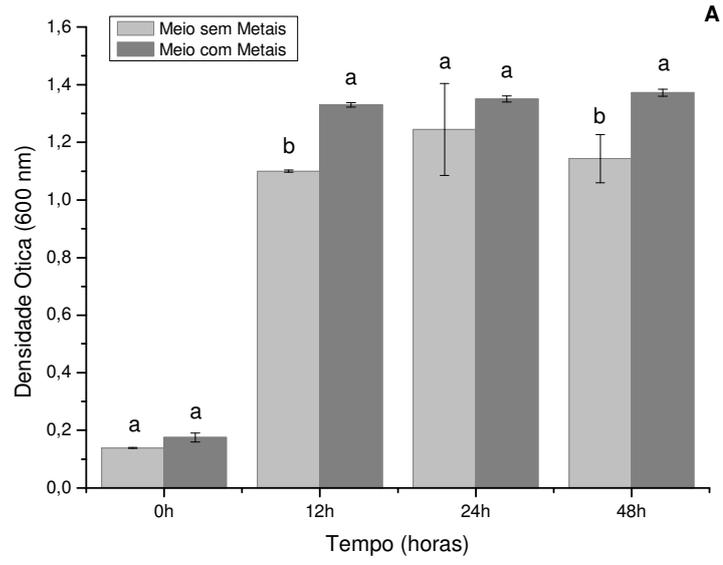


Figura 3: Crescimento (A), atividade de protease (B) e α -amilase (C) de culturas submersas de *Bacillus sp.* SMIA-2 contendo soro de queijo (0,25%, p/v) e farinha de maracujá (0,15%, p/v) a 50°C e 150 rpm.

O crescimento de *Bacillus sp.* SMIA-2 e a atividade das enzimas protease e α -amilase em função do tempo de fermentação, foram observados por 96 horas no meio soro de queijo (0,5%, p/v) suplementado com a farinha de maracujá (0,15%, p/v) e metais (Figura 4). O crescimento do micro-organismo foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura, sendo a fase exponencial de crescimento observada durante as primeiras 12 horas de cultivo. Após esse tempo, a velocidade de crescimento reduziu marcando assim a fase estacionária da cultura.

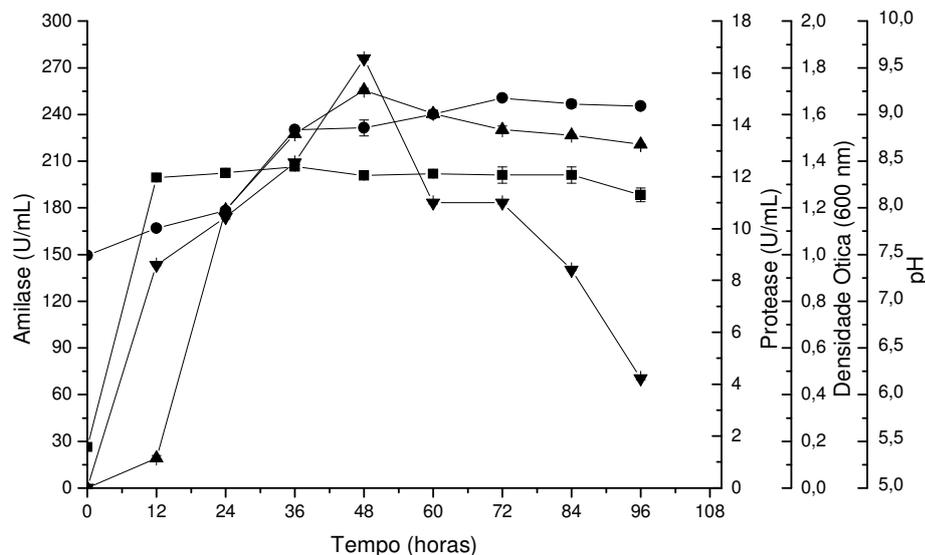


Figura 4: Crescimento (■), produção de amilase (▲), produção de protease (▼) e pH do meio de cultura (●) em função do tempo de cultivo de *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado em 0,5% (p/v) soro de queijo, suplementados com 0,25% (p/v) de farinha da casca de maracujá e minerais.

A atividade máxima da protease (16,2 U/mL) e da α -amilase (254,8 U/mL) foi observada com 48 horas de incubação, quando a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento. De acordo com Mehrotra *et al.* (1999), a secreção de proteases por micro-organismos é uma manifestação da escassez de

nutrientes no início da fase estacionária, estando dessa maneira fortemente influenciada pelos componentes do meio. Da mesma forma, os resultados sugerem que a indução efetiva da α -amilase não ocorre até que a fase estacionária seja alcançada e corroboram com os achados por Asgher *et al.* (2007) e Konsoula e Liakopoulou-Kyriakides (2007). A obtenção da protease e α -amilase em um único passo fermentativo significa a simplificação do controle da produção simultânea destas enzimas.

Após alcançarem o valor máximo a atividade das enzimas protease e α -amilase decresceram, sendo este decréscimo mais pronunciado para a protease. Segundo Nascimento *et al.* (2007), esse processo de inativação é característico na produção de proteases por micro-organismos.

O pH do meio aumentou com o início do desenvolvimento microbiano e da produção das enzimas protease e α -amilase, provavelmente devido ao consumo de nitrogênio orgânico, como aminoácidos e peptídeos, e estabilizou próximo a 9,0 após a enzima alcançar sua máxima atividade. Devido a essa relação entre pH e a síntese de proteases, a variação do pH pode ser utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção das enzimas, como o início e o final de sua síntese.

Para a determinação da temperatura ótima da α -amilase o micro-organismo foi crescido no meio contendo os resíduos por 48 horas a 50°C e atividade da enzima determinada na faixa de temperatura de 60 a 100°C. Com o aumento da temperatura na faixa de 60°C a 90°C foi observado um aumento na atividade da α -amilase (Figura 5A). Uma redução na atividade desta enzima foi observada em valores acima de 90°C. A temperatura ótima dessa α -amilase foi a 90°C, que foi mais alta ou similar com outras α -amilases descritas por outras pesquisas com *Bacillus* (Corrêa, 2009; Carvalho *et al.*, 2008a; Carvalho *et al.*, 2008b; Burhan *et al.*, 2003). Em temperaturas mais elevadas a enzima teve sua atividade reduzida perdendo em torno de 8,5% de sua atividade na temperatura de 100°C. Em relação à estabilidade térmica, α -amilase reteve 48,68%, 21,17% e 17,71% de sua atividade após 15 minutos a 80, 90 e 100°C, respectivamente (Figura 5B).

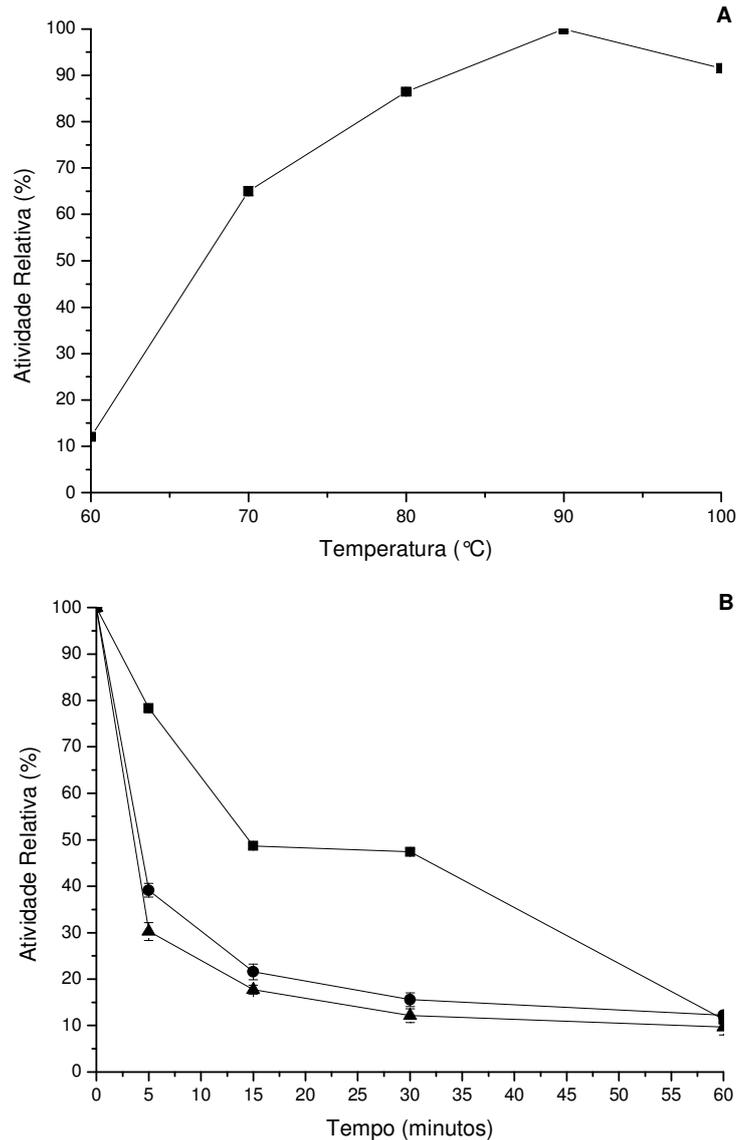


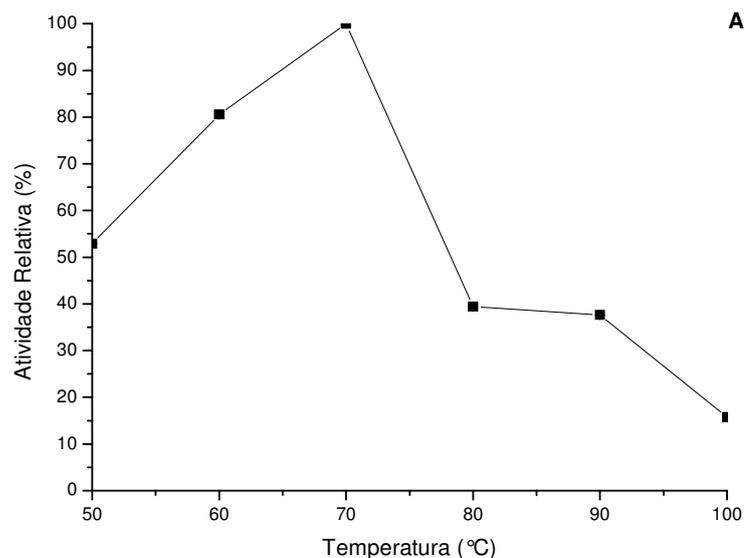
Figura 5: Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) de α -amilase [(■) 80°C; (●) 90°C; (▲) 100°C] produzida por *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 178,82 U/mL).

A atividade da protease aumentou com o acréscimo da temperatura, atingindo seu valor máximo a 70°C (Figura 6A). Nas temperaturas de 80°C, 90°C e 100°C a enzima apresentou 39,40%, 37,61% e 15,74% de sua atividade, máxima, respectivamente. De acordo com Olajuyigbe e Ajele (2008), em estudos realizados com a cepa de *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolada de amostras de feijão africano e produtora desta enzima, a temperatura ótima para a atividade da

protease foi de 60°C. A enzima mostrou-se estável em 95% a 60°C após 60 minutos de incubação, enquanto a 70°C, foi de cerca de 60% estável. O pH ótimo da protease foi de 8,0 e a enzima foi estável em uma ampla faixa de pH (5,0-11,0) apesar de um decréscimo de cerca de 30% e 18%, quando sua atividade original foi observada em pH 5,0 e 6,0, respectivamente.

Manachini e Fortina (1998) em estudos realizados com uma cepa de *Bacillus licheniformis* SMI 4.C.1. isolado de águas marinhas e produtor de proteases alcalinas, citam que a melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de 70°C quando o ensaio foi realizado em pH 9 (pH ótimo). A enzima manteve 60% da sua atividade após 30 minutos de aquecimento a 70°C.

Os resultados observados neste trabalho para a estabilidade térmica mostraram que a protease reteve 72,10%, 65,98 e 7,54% de sua atividade após 15 minutos a 60, 70 e 80°C, respectivamente (Figura 6B).



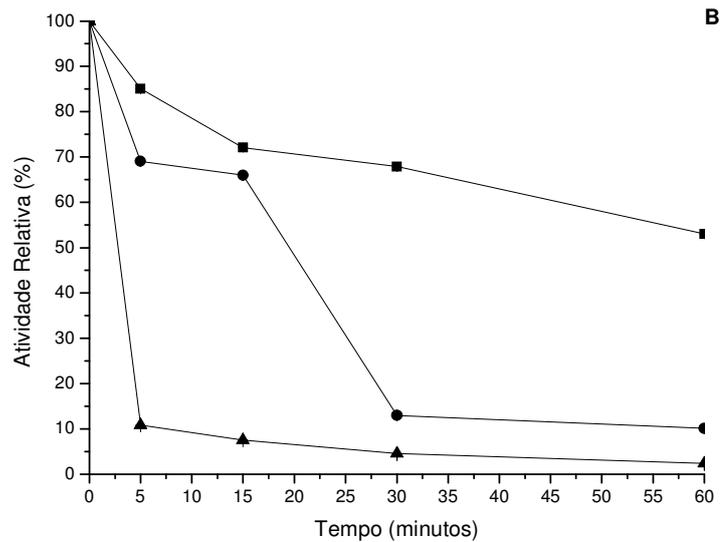


Figura 6: Temperatura ótima (A) e estabilidade (B) de protease [(■) 60°C; (●) 70°C; (▲) 80°C] produzida por *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 14,24 U/mL).

Para determinação do pH ótimo da protease e da α -amilase, as soluções dos substratos das respectivas enzimas foram preparadas em solução tampão a diferentes valores de pH.

A α -amilase foi ativa em uma ampla faixa de pH variando de 6,5 a 9,5 apresentando máxima atividade em pH 9,0 (Figura 7A). A atividade mais baixa da α -amilase foi encontrada em pH 6,0 e 10, que foram os valores mais extremos estudados. Em relação à estabilidade ao pH, a enzima foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente, em solução tampão preparada com diferentes valores de pH (6,5 a 10,0). A enzima manteve 51,42% e 42,20% de sua atividade quando incubada por 2 horas em pH 8,0 e pH 9,0 respectivamente (Figura 7A).

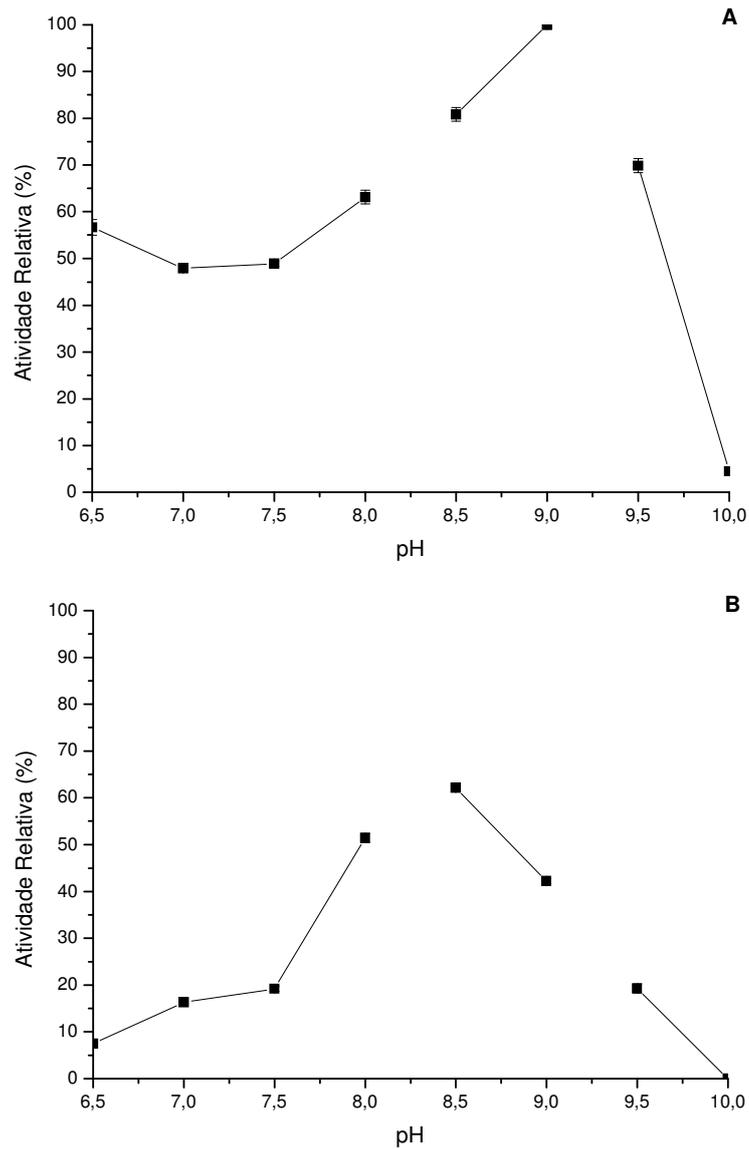


Figura 7: pH ótimo (A) e estabilidade (B) de α -amilase produzida por *Bacillus sp.* SMIA-2 cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 129,71 U/mL).

As proteases se mostraram ativas entre pH 6,0 a 10,0, sendo o pH ótimo para atividade da enzima 8,5. A atividade enzimática em 9,5 e 10,0 foi 62,38% e 26,52%, respectivamente em relação à apresentada em pH 8,5 (Figura 8A). A atividade residual da protease incubada a diferentes valores de pH por um período de 2 horas foi também estimada. A enzima foi mais estável na faixa de pH de 8,5 a 9,0 enquanto que o pH 9,5 e 10,0, 58,28% e 67,40% da atividade original

foram perdidos, respectivamente, em relação à atividade máxima.

Essa faixa de pH para atividade da protease de *Bacillus sp.* SMIA-2 corrobora com várias citações da literatura que mostram um pH ótimo de 8-12 para as proteases de *Bacillus sp.* *Thermus aquaticus*, *Xanthomonas maltophila*, *Vibrio metschnikovii*, dentre outros (Maal *et al.*, 2009; Olajuyigbe e Ajele, 2008; Silva *et al.*, 2007; Nascimento e Martins, 2006; Nascimento e Martins, 2004; Debette, 1991).

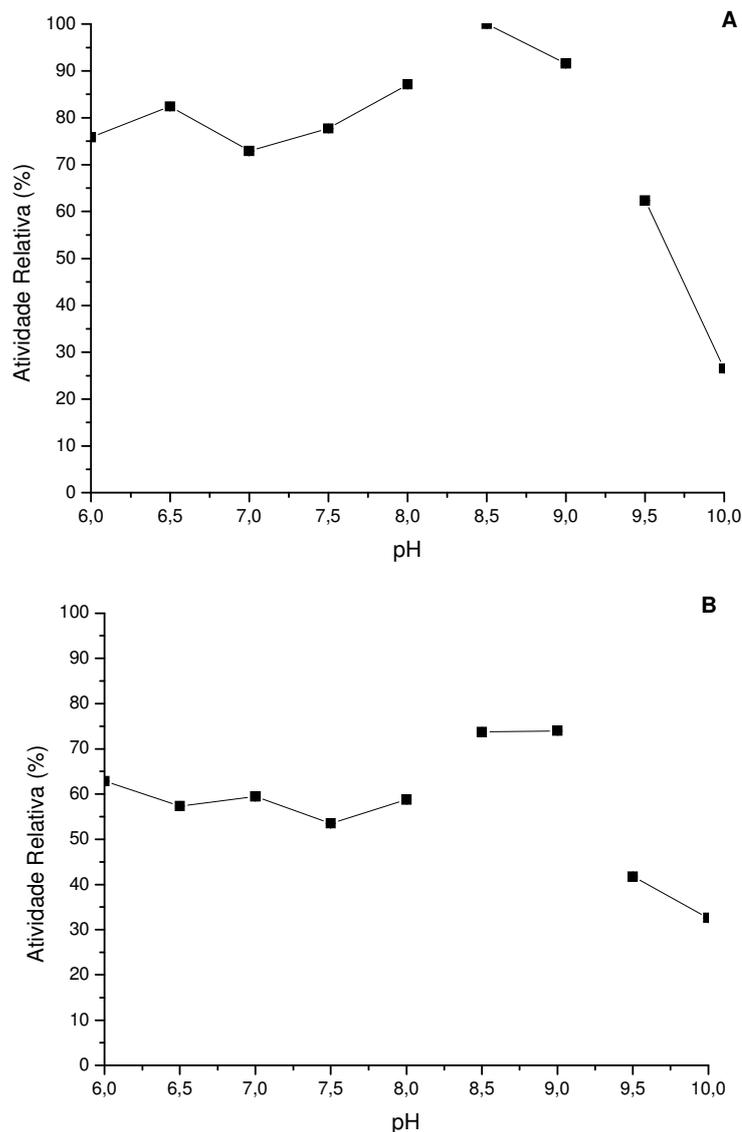


Figura 8: pH ótimo (A) e estabilidade (B) de protease produzida por *Bacillus sp.* cultivado em meio soro de queijo (0,5%, p/v) adicionado de 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá e metais a 50°C por 48 horas. A atividade relativa é expressa como uma porcentagem do máximo (100% da atividade da enzima = 14,33 U/mL).

3.2.4. CONCLUSÕES

Bacillus sp. SMIA-2 multiplicou-se e secretou simultaneamente α -amilase e proteases quando cultivado no meio soro de queijo (0,5%, p/v) e farinha da casca de maracujá (0,15%, p/v). A maior atividade da α -amilase (255,73 U/mL) e da protease (16,55 U/mL) foi encontrada durante a fase estacionária de crescimento. A adição de metais ao meio de cultivo, influenciou na multiplicação e na atividade das enzimas.

A atividade ótima da α -amilase foi encontrada em pH 8,0 e 90°C enquanto a das proteases em pH 8,5 e 70°C. Quanto à termoestabilidade, a α -amilase e protease mantiveram 21,17% e 65,98% de sua atividade máxima quando incubadas a 90°C e 70°C, respectivamente, por 15 minutos. Resultados obtidos neste trabalho permitem sugerir a utilização de proteases e α -amilases produzidas por *Bacillus sp.* SMIA-2 em vários setores industriais.

3.2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ashger, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L.A. (2007) Thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering*, 79: 950-955.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38, 1397-1403.
- Carvalho, R.V., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, n.1, p.1-7.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, p. 102-107.
- Corrêa, T.L.R. (2009) Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 76p.
- Cruz, C.D. (2006) *Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes*. 1ª ed. Viçosa: Editora UFV, v. 1, 285p.
- Debette, J. (1991) Isolation and characterization of an extracellular protease produced by a soil of *Xantomonas maltophila*. *Curr Microbiol*. 22:85-90.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. (2008) Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J Microbiol Biotechnol*, 24:2027-2034.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. (2002b) An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbiol Biotechnol*. 60:381-395.
- Haq I., Ashraf H., Shuh, A.T. (2002) Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of alpha amylase. *Biotechnol*. 1: 61-66.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994) Effect of culture conditions on the production of a extracellular proteinase by *Thermus sp.* Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 400-406.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus sp.*. JB-99 in a chemically

- defined medium. *Process Biochem.* 37:139-144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry.* 40:1263-1270.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kiriakides, M. (2007) Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98 :150-157.
- Maal, K.B., Emtiazi, G., Nahvi, I. (2009) Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3(9) pp. 491-497.
- Manachini, P.L., Fortina, M.G. (1998) Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters.* 6(20):565-568.
- Menezes, G.D.G., Oliveira, A.C.P., Damaso, M.C.T., Oliveira, M.A.C.L.; Couri, S. (2006) Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Rev. Univ. Rural*, n.1, p.15-27.
- Mehrotra, S.; Pandey, P.K., Guar, R., Darmwal, N.S. (1999) The production of alkaline protease by a *Bacillus* sp. species isolate. *Bioresour. Technol.* 67: 201-203.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.* 3: 426-428.
- Nascimento, W.C.A., Silva, C.R., Carvalho, R.V., Martins, M.L.L. (2007) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(2): 417-421.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology.* 37:307-311.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2004) Production and properties of extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 91-96.
- Nascimento, W.C.A. (2004) Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. (2008) Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolated from “iru”, a traditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research*, Vol.2 (10),

pp.206-210.

- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Chagas-Júnior, A.F. (2007) Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(1): 61-66.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C. (2005) *Enzyme Technology*. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc.
- Rodrigues, A.B.C., Almeida, C.A.V., Rocha, C.P., Filho, U.C., Cardoso, V.L. (2009) Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*. *IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica*. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Soares, I.A., Flores, A.C., Zanettin, A., Pin, H.K., Mendonça, M.M., Barcelos, R.P., Trevisol, L.R., Carvalho, R.D., Schauren, D., Rocha, L.M.S.C., Baroni, S. (2010) Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentosso *Aspergillus nidulans*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 30(3): 700-705, 2010.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus sp.* and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:253-258.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275.
- Tari, C., Genckal, H., Tokatli, F. (2006) Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.*L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Togashi, C.K., Fonseca, J.B., Soares, T.N., Gaspar, A.R.E. (2007) Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 6, p. 2063-2068.

4. RESUMO E CONCLUSÕES

A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertence ao grupo das hidrolases, dentre as quais se destacam as amilases e proteases. O maior custo para a produção destas enzimas em escala industrial reside no meio de cultivo empregado para a obtenção das mesmas, principalmente em relação às fontes de carbono e nitrogênio. Este trabalho, visando buscar novas alternativas para tornar o custo de produção das enzimas proteases e α -amilase mais acessível, avaliou a produção destas enzimas por uma bactéria termofílica, *Bacillus sp.* SMIA-2, utilizando substratos de baixo custo.

Bacillus sp. SMIA-2 produziu proteases quando cultivado em solução (0,5% p/v) de soro de queijo em pó (SQP) e farinha da casca de maracujá (0,25% p/v) e atingiu um máximo em 72 horas, com níveis de 11,40 U/mL. Estudos sobre a caracterização da protease demonstraram que a temperatura ótima desta enzima foi de 70°C. Em relação à termoestabilidade da enzima, a protease manteve 70% da atividade original após 30 minutos de incubação a 60°C e a 70°C, 65% da atividade original foi mantida após 15 minutos. O pH ótimo da enzima foi de 9,0 e a mesma enzima foi estável em pH entre 6,0 e 9,0, sendo constatada maior estabilidade em valores de pH entre 8,5 e 9,0.

Bacillus sp. SMIA-2 produziu simultaneamente α -amilase e protease em culturas em batelada contendo soro de queijo em pó e farinha da casca de maracujá. As maiores atividades da α -amilase e protease obtidas quando o micro-organismo foi cultivado no meio contendo 0,5% (p/v) de soro de queijo e 0,15% (p/v) de farinha da casca de maracujá foram encontradas na fase estacionária de crescimento. A suplementação do meio de crescimento com metais aumentou a

atividade de ambas as enzimas e o crescimento do micro-organismo. Estudos sobre a caracterização das enzimas revelaram que a característica mais importantes foi a alta temperatura ótima para atividade da α -amilase (90°C) e da protease (70°C). A α -amilase e protease mantiveram 21,17% e 65,98% de sua atividade máxima quando incubadas a 90°C e 70°C, respectivamente, por 15 minutos. A atividade ótima da α -amilase foi em pH 8,0 enquanto que para a atividade da protease foi em pH 9,0.

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível realizar a produção simultânea de α -amilase e proteases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2 utilizando soro de queijo e farinha da casca de maracujá como meio de cultivo. As características apresentadas pelas enzimas permitem sugerir que as mesmas possam ser utilizadas em vários setores industriais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adans, M., Kelly, R. (1998) Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnol.* 16, 239-332.
- Aguilar, C.N., Gutiérrez-Sánchez, G., Rado-Barragán, P., Rodríguez-Herrera, R., Martínez-Hernandez, J.L., Contreras-Esquivel, J.C. (2008) Perspectives of Solid State Fermentation for Production of Food Enzymes. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology.* 4(4): 354-366.
- Akhtar, N., Ghauri, M.A., Iqbal, A., Anwar, M.A., Akhtar, K. (2008) Biodiversity and phylogenetic analysis of culturable bacteria Indigenous to khewra salt mine of pakistan and their industrial importance. *Brazilian Journal of Microbiology.* 39:143-150.
- Andrade, C.M.M.C., Pereira JR., N., Antanikian, G. (1999) Extremely Thermophilic Microorganisms and their polymer-hidrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia,* 30:287-298.
- Antunes, A.J. (2003) *Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino*, 1ª ed., Editora Manole Ltda.
- Aquino, A.C.M.H. (2000) Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum*. Tese (Mestrado em Biologia comparada) – Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo – USP, 121p.
- Araújo, L.F., Medeiros, A.N., Perazzo Neto, A., Oliveira, L.S.C., Silva, F.L.H. (2005) Protein enrichment of cactus Pear (*Opuntia ficus – indica* Mill) using *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology,* Curitiba, v.48, special n., p.161-168.
- Ashger, M., Asad, M.J., Rahman, S.U., Legge, R.L.A. (2007) Thermostable α -mylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. *Journal of Food Engineering,* 79: 950-955.
- Atomi, H. (2005) Recent progress towards the application of hyperthermophiles and

their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* .9:166-173.

- Banerjee, U. C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35:213-219.
- Barbosa, A.S., Florentino, E.R., Florêncio, I.M., Araújo, A.S. (2010) Utilização do soro como substrato para produção de aguardente: estudo cinético da produção de etanol. *Revista Verde* (Mossoró – RN – Brasil) v.5, n.1, p.07-25.
- Beg, Q.K., Gupta, R. (2003) Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microbial. Technol.* 32, 294-304.
- Beg, Q.K., Saxena, R.K., Gupta, R. (2002) De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under feed batch operations. *Process Biochemistry*, 78:289-295.
- Bhaskar, E., Sudeepa, E.S., Rashmi, H.N., Selvi, A.T. (2007) Partial purification and characterization of protease of *Bacillus proteolyticus* CFR 3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. *Bioresource Technology*. 98:2758-2764.
- Bieger, A., Lima, J.F. (2008) Empresa e desenvolvimento sustentável: um estudo de caso da Sooro. *Revista da FAE*, Curitiba, v.11, n.2, p.61-67.
- Bon, E.P.S. (1995) A tecnologia enzimática no Brasil, *Enzitec*. 95, 9-14.
- Borges, P.F.Z., Sgarbieri, V.C., Dias, N.F.G., Jacobucci, H.B., Pacheco, M.T.B., Baldini, V.L.S. (2001). Produção piloto de concentrados de proteínas de leite bovino: composição e valor nutritivo. *Brazilian Journal of Food Technology*, Campinas, v. 4, p.1-8.
- Burhan, A., Nisa, U., Gökhan, C., Ömer, C., Ashabil, A., Osman, G. (2003) Enzymatic properties of a novel thermostable, thermophilic, alkaline and chelator resistant amylase from an alkaliphilic *Bacillus sp.* Isolate ANT-6. *Process Biochemistry*. 38, 1397-1403.
- Buzzini, P., Martini, A. (2002) Extracellular enzymatic activity profiles in yeast and yeast like strains isolated from tropical environments. *J. Applied Microbiol.* 93: 1020-1025.
- Capitani, C.D., Pacheco, M.T.B., Gumerato, H.F., Vitali, A., Schimidt, F.L. (2005) Recuperação de proteínas do soro de leite por meio de coacervação com polissacarídeo. *Revista de Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 11, p. 1123-1128.
- Cardoso, C.L. (2009) Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 175-187.

- Carmelo, V., Florido, A., Vinhas, I., Roseiro, J.C. (2002) Physiological responses of *Bacillus stearothermophilus* continuous culture to carbon source concentration and temperature shifts. *Process Biochemistry*, 38:763-770.
- Carvalho, R.V., Correa, T.L.R., Silva, J.C.M., Viana, A.P., Martins, M.L.L. (2008a) Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus sp.* e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, n.1, p.1-7.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008b) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, p. 102-107.
- Chauhan, B., Gupta, R. (2004) Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* RGR-14. *Process Biochem.* 39, 2115–2122.
- Cheng, K., Lu, F.P., Li, M., Liu, L.L., Lian, X.M. (2010) Purification and biochemical characterization of a serine alkaline protease TC4 from a new isolated *Bacillus alcalophilus* TCCC11004 in detergent formulations. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 9(31), pp. 4942-4953.
- Cordeiro, C.A.M., Martins, M.L.L. (2009) Produção de poligalacturonases pelo termofílico *Bacillus sp.* SMIA-2 e algumas propriedades da enzima. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, p. 1-7.
- Córdova, K.R.V., Gama, T.M.M.T.B., Winter, C.M.G., Neto, G.K., Freitas, R.J.S. (2005) Características físico-químicas da casca do maracujá amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa* Degener) obtida por secagem. *Bol Cent Pesqui Process Aliment* 23: 221-230.
- Corrêa, T.L.R. (2009) Produção simultânea de α -amilase e proteases pelo *Bacillus sp.* SMIA-2 termofílico e aplicação destas enzimas em formulações de detergente. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 76p.
- Cruz, Cosme Damião. *Programa Genes - Estatística Experimental e Matrizes*. 1ª. ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. v. 1, 285p.
- Debette, J. (1991) Isolation and characterization of an extracellular protease produced by a soil of *Xantomonas maltophilia*. *Curr Microbial.* 22:85-90.
- Dixon, M., Webb, E.C. (1979). *Enzymes*. Academic Press: New York.
- Dias, D.R., Vilela, D.M., Silvestre, M.P.C., Schwan, R.F. (2008) Alkaline protease from *Bacillus sp.* isolated from coffee bean grown on cheese whey. *World J. Microbiol Biotechnol.* 24:2027–2034.
- Do Canto, W.L., Menezes, T.J.B. (1995) *Estudos Econômicos – Alimentos Processados: Produção, usos e mercado de enzimas*. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.

- Ellouz, Y., Bayouhd, S., Kammoun, N., Gharsallah, N., Nasri, M. (2001) Production of protease by *Bacillus substilis* grown on sardinelle heads and viscera flour. *Biores. Technol.* 80: 49-51.
- Estadão de São Paulo. (2007) *Soro de leite: de resíduo a alimento*. Estadão, São Paulo – SP, 10 out. 2007. Seção Economia. Disponível em: <http://www.estadao.com.br/economia/not_eco63001,0.htm>. Acesso em: 16 de novembro de 2010.
- Egorova K., Antranikian, G. (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology.* 8: 649-655.
- Feijoo, G., Moreira, M.T., Roca, E., Lema, J.M. (1999) Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp.BOS55. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology.* 23:86-90.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N. (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology,* 10: 207-214.
- Ferrero, M.A., Castro, G.R., Abate, C.M., Baigori, M.D., Singeriz, F. (1996) Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 327-332.
- Fields, P.A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and physiology.* 129:417-431.
- Fornari, R.C.G. (2006) *Aproveitamento de soro de queijo para a produção de goma Xantana*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Erechim, RS, 98p.
- Gacesa, P., Hubble, J. (1990) *Tecnologia de las enzimas*. Ed Acribia, S.A. Zagarosa-Espanha.
- Genckal, H., Tari, C. (2006) Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. Isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology,* 39:703-710.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., Mattiasson, B. (2003) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microbiology Technology,* 32:519–524.
- Giroto, J.M., Pawlowsky, U. (2001) O soro de leite e as alternativas para o seu beneficiamento. *Brasil Alimentos.* N° 10. (Set/Out). 2001. Disponível em: <<http://www.signuseditora.com.br/BA/pdf/10/10%20-%20Laticinios.pdf>> Acesso em 15/12/2010.
- Ghorbel, B., Kamoun, A.S., Nasri, M. (2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology.* 32:513-518.
- Godfrey, T., West, S. (1996) *Industrial Enzimology.* 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p.

- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Revista Química Nova*. 30:136-145.
- Goyal, N., Gupta, J.K., Soni, S.K. (2005) A novel raw starch digesting thermostable α -amylase from *Bacillus sp.* I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microbial Technology* 37, 723–734.
- Guangrong, H., Dehui, D., Weilian, H., Jiabin, J. (2008) Optimization of medium composition for thermostable protease production by *Bacillus sp.* HS08 with a statistical method. *African Journal of Biotechnology*. Vol. 7 (8), pp. 1115-1122.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Lorenz, P. (2002a) Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 15-32.
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. (2002b) An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:381-395.
- Guertzenstein, S.M.J., Srur, A.U.O.S. (2002) Uso da casca de maracujá (*Passiflora edulis*, f. flavicarpa, DEG) cv amarelo na alimentação de ratos (*rattus norvegicus*) normais e diabéticos. *Rev. Cadernos do Centro Universitário São Camilo*, 10(2) 213-218.
- Hadj-Ali, N., Saxena, R.K., Gupta, R. (2007) Biochemical and molecular characterization of a detergent stable alkaline serine-protease from a newly isolated *Bacillus licheniformis* NH1. *Enzyme and microbial Technology*, 40, 515-523.
- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34.
- Han, X.Q., Damodaran, S. (1997) Isolation, identification and fermentation of a *Bacillus sp.* producing a detergent-stable endopeptidase. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 4191-4195.
- Haq, I., Ashraf, H., Shuh, A.T. (2002) Isolation and screening of fungi for the biosynthesis of alpha amylase. *Biotechnol.* 1: 61-66.
- Hartzell, M.M., Hsieh, Y.L. (1998) Enzymatic scouring to improve cotton fabric wettability. *Text. Res. J.*, v. 68, n. 4, p. 233-241.
- Hasan, F., Ali Shah, A., Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb. Technol.*, 39, 235.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Gerra, N.P., Rosés, R.P. (2006) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, v. 73, p. 93-100.
- Horikoshi, K. (1990) Enzymes of alkalophilic. In: *Microbial Enzyme and Biotechnology*. 2nd, 275-94.
- Hough, D.W., Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*,

3: 39-46.

- Ishimoto, F.Y., Harada, A.I., Branco, I.G., Conceição, W.A.S., Coutinho, M.R. (2007) Aproveitamento Alternativo da Casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para Produção de Biscoitos. *Revista Ciências Exatas e Naturais*. Vol. 9, nº2.
- Ichimura, T., Yamanaka, A., Ichiba, T., Toyokawa, T., Kamada, Y., Tamamura, T., Maruyama, S. (2006) Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Bioch* 70: 718-721.
- Jaenicke, R., Bohm, G. (1998) The stability of Proteins in Extreme Environments. *Currents Opinion in Structural Biology*. V. 8, p. 738-748.
- Janssen, P.H., Peek, K., Morgan, H.W. (1994) Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp.Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 400-406.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001) Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37: 139-144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grown on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40:1263-1270.
- Joo, H., Kumar, C.G., Park, G., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C. (2002) Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*. v. 38, p. 155-159.
- Kiran, K.K., Chandra, T.S. (2008) Production of surfactant and detergent-stable, halophilic, and alkalitolerant alpha-amylase by a moderately halophilic *Bacillus* sp. Strain TSCVKK. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77, 1023–1031.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 13 n. 4, p. 345-351.
- Kliemann, E., Simas, K.N., Amante, E.R., Prudêncio, E., Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C., Amboni, R.D.M.C. (2009) Optimisation of pectin acid extraction from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 476–483.
- Koeller, K.M., Wong, C.H. (2001) Enzymes for chemical synthesis. *Nature*. 409, 232.
- Konsoula, Z., Liakopoulou-Kiriakides, M. (2007) Co-production of α -amylase and β -galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organic substrates. *Bioresource Technology*, 98 :150-157.
- Kosikowski, F.V. (1979) Our Industry Today. *Journal Dairy Science*, 62:1149-1160.
- Kuberan, T., Sangaralingam, S., Arasu, S.T. (2010) Isolation and optimization of

- Protease producing Bacteria from Halophilic soil. *J. Biosci. Res.*, Vol. 1(3):163-174.
- Kumar, C.G., Parrack, P. (2003) Arrowroot (*Marantha arundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, V.19, N.7, pp. 757-762(6).
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
- Kumar, C.G., Tiwari, M.P., Jany, K.D. (1999) Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus spp.*: Purification and some properties. *Process Biochem.* 34, 441-449.
- Ladeira, S.A. (2009) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 e propriedades da enzima. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 86p.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V.H., Martins, M.L.L. (2010) 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. *Revista Química Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-5.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N. (2003) Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 26:63-67.
- Lima, U.A., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. (2001) *Biotecnologia industrial. V3: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. 1ªed. Editora Edgard Blucher Ltda. 616p.
- Liu, Y., Shi, J., Langrish, T.A.G. (2006) Water-based extraction of pectin from flavedo and albedo of orange peels. *Chem. Eng. J.* 120, 203–209.
- Maal, K.B., Emtiazi, G., Nahvi, I. (2009) Production of alkaline protease by *Bacillus cereus* and *Bacillus polymixa* in new industrial culture mediums and its immobilization. *African Journal of Microbiology Research*, Vol. 3(9) pp. 491-497.
- Madigan, M.T., Oren, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles, *Current Opinion in Microbiology*. v. 2, p. 265-269.
- Mahmood, A.U., Greenman, J., Scragg, A.H. (1998) Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture. *Enzyme Microbial Technol.*, 22, 130-137.
- Manachini, P.L., Fortina, M.G. (1998) Production in sea-water of thermostable alkaline proteases by a halotolerant strain of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. 6(20):565-568.

- Manachini, P.L., Fortina, M.G., Parini, C. (1988) Thermostable alkaline protease produced by *Bacillus thermoruber* a new species of *Bacillus*. *Appl. Microbiol.* 28, 409-413.
- Markoglou, N., Wainer, I.W. (2003) *Bioanalytical Separations*. Wilson, I.D., ed.; Elsevier Science: New York, cap. 7.
- Massucco, A.E., Mazza, L.A., Balatti, A.P. (1978) Production of alkaline protease from acid cheese whey. *Rev. Asoc. Argent Microbiol.* 10(1):14-19.
- Medina, J. C. (1980) Subprodutos. In MEDINA, J. C. et al., *Maracujá: da cultura ao processamento e comercialização*. Campinas: Inst Tecnol. Alim. p.145-148.
- Mehrotra, S.; Pandey, P.K., Guar, R., Darmwal, N.S. (1999) The production of alkaline protease by a *Bacillus* sp. ecies isolate. *Bioresour. Technol.* 67: 201-203.
- Menezes, G.D.G., Oliveira, A.C.P., Damaso, M.C.T., Oliveira, M.A.C.L.; Couri, S. (2006) Produção de poligalacturonase pela linhagem *Aspergillus niger* mutante 3T5B8 em fermentação semi-sólida utilizando como substrato resíduo de maracujá e farelo de trigo. *Rev. Univ. Rural*, n.1, p.15-27.
- Merheb, C.W., Cabral, H., Gomes, E., Silva, R. (2007) Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104, 127–131.
- Mesomo, M.C. (2007) *Produção de goma xantana em biorreator utilizando meio à base de soro de queijo*. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Erechim, RS, 90p.
- Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem* 3: 426-428.
- Ming Chu, I., Lee, C., Li, T.S. (1992) Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, n. 4, p. 755-761.
- Mitidieri, S., Martinelli, A.H.S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2006) Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*. A comparative study with commercial detergent formulations. *Bioresource Technology*, 97, 1217–1224.
- Moon, S.H., Parulekar, S.J. (1992). Some Observations on Protease Production in continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:43-54.
- Moresi, M. (1994) Cost/benefit analysis of yeast and yeast autolysate production from cheese whey. *Italian J. Food Sci*, 6, 357-370.
- Mussato, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007) Enzimas: ferramentas poderosa na industria. *Instituto Ciência Hoje*. 41:28-33.

- Nascimento, W.C.A., Carvalho, R.V., Silva, C.R., Martins, M.L.L. (2007) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp.* termofílico. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27:417-421.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2006) Studies on the stability of protease from *Bacillus sp.* and its compatibility with commercial detergent. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37:307-311.
- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus sp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 91-96.
- Nascimento, W.C.A. (2004) Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 96p.
- Nicolau, E.S., Squilassi, K.M.B.S., Cota, M.A.B.O., Mesquita, A.J., Queiroz, G.M. (2004) Soro de Queijo – Importância e Características Nutricionais. 2004. Disponível em: <http://www.laticinio.net/inf_tecnicas.asp?cod=40> Acesso em 10/01/2011.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 51, p. 711-29.
- Nielsen, J.E., Borchert, T.V. (2000) Protein engineering of bacterial α -amylases. *Biochemistry Biophysical Acta*, 1543, 253–274.
- Nielsen, R.I., Oxenbøll, K. (1998) Enzymes from fungi: their technology and uses. *Mycologist*, v. 12, n.3, p. 69-71.
- Olajuyigbe, F.M., Ajele, J.O. (2008) Some properties of extracellular protease from *Bacillus licheniformis* LBBL-11 isolated from “iru”, a traditionally fermented African locust bean condiment. *African Journal of Biochemistry Research*, Vol.2 (10), pp.206-210.
- Oliveira, E.M.S. (2009) *Avaliação do processo de separação e purificação dos resíduos do maracujá-amarelo para obtenção de farinha da casca e pectina*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 146p.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Chagas-Júnior, A.F. (2007) Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(1): 61-66.
- Oliveira, A.N., Oliveira, L.A., Andrade, J.S., Júnior, A.F.C. (2006) Enzimas hidrolíticas extracelulares de isolados de rizóbia nativos da Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, n.4, p. 853-860.
- Oliveira, V.M. (2006) Formulação de bebida Láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-

- química, análises bacteriológicas e sensoriais. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Niterói – RJ, Universidade Federal Fluminense – UFF, 78p.
- Oliveira, L.F., Nascimento, M. R. F., Borges, S.V., Ribeiro, P.C.N., Ruback, V.R. (2002) Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis F. Flavicarpa*) para produção de doce em calda. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.22, n.3, p.259-262.
- Oskouie, S.F.G., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Eftekhari, F. (2008) Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.* 39, 37-42.
- Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R., Larroche, C. (2005) *Enzyme Technology*. 1. ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R. (2000) Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. 74:81-87.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci.*, v. 77, n. 1, p. 149-162.
- Pandey, A.; Soccol, C.R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 41, p. 379–390.
- Pastor, M.D., Lorda, G.S., Balatti, A. (2001) Protease obtention using *Bacillus subtilis* 3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:6-9.
- Phadataré, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus toronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 72-76.
- Pinheiro, E.R., Silva, I.M.D.A., Gonzaga, L.V., Amante, Edna R., Teófilo, R.F., Ferreira, M.M.C., Amboni, R.D.M.C. (2008) Optimization of extraction of high-ester pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) with citric acid by using response surface methodology. *Bioresource Technology*. 99 (2008) 5561–5566.
- Pszczola, D.E. (2001) Rice: not just for throwing. *Food Technology*, v. 55, n. 2, p. 53-59.
- Rao, Y.K., Lu, S.C., Liu, B.L., Tzeng, Y.M. (2006) Enhanced production of an extracellular protease from *Beauveria bassiana* by optimization of cultivation processes. *Biochem. Eng. J.* 28, 57.
- Rao, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 597-635.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y., Yun, J., Ryu, H. (2008) Optimization of alkaline protease

- production by batch culture of *Bacillus sp.* RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*. 99:2242-2258.
- Révillion, J.P., Brandelli, A., Ayub, M.A.Z. (2000) Produção de extrato de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: Abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 20(2).
- Richards, N.S.P.S. (2002) Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. *Revista Food ingredients*. n.17, p. 20-37.
- Richards, N.S.P.S. (1997) Emprego racional do soro lácteo. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, n.9, p.67-69.
- Rodrigues, A.B.C., Almeida, C.A.V., Rocha, C.P., Filho, U.C., Cardoso, V.L. (2009) Fermentação de resíduos de arroz e maracujá na produção de invertase e amilase por *Aspergillus niger*. *IX Encontro Interno e XIII Seminário de Iniciação Científica*. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia, MG.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Díaz, M., Quirós, L.M. (2001) Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*. 36:507-515.
- Sabir, J.S.M., El-Bestawy, E. (2009) Enhancement of alkaline protease production in *Bacillus circulans* using plasmid transformation. *World J Microbiol Biotechnol*. 25:2021–2027.
- Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005) A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus sp.*KR-8104. *Enzyme and Microbial Technology*, 36: 666-671.
- Sarikaya, E., Higasa, T., Adachi, M., Mikami, B. (2000) Comparison of degradation abilities of α - and β -amylase on raw starch granules. *Process Biochemistry*, 35: 711-715.
- Scandurra, R., Consalvi, V., Chiaraluce, R., Politi, L., Engel, P.C. (1998) Protein Thermostability in Extremophiles. *Biochimie*. 80: 933-941.
- Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, O.P. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canad. J. Microbiol*. 50, 1-17.
- Sena, A.R., Koblitz, M.G.B., Neto, A.G., Uetanabaro, A.P.T. (2006) Seleção de fungos do semi-árido baiano secretores de hidrolases de interesse em alimentos. *Sitientibus*, Feira de Santana, n.35, p.91-98.
- Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S., Hashimoto, H., Kai, Y., Takagi, M., Imanaka T. (2001) Comparative analyses of the conformational stability of a hyperthermophilic protein and its mesophilic counterpart. *Eur J Biochemistry*. V.268, n. 15, p. 4144–4150.

- Shreve, R.N., Brink, Jr.J.A. (1977) *Indústrias de processos químicos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 484-485.
- Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus sp.* and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:253-258.
- Silva, C.R. (2006) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por *Bacillus sp.* SMIA-2. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 66p.
- Silva, K., Bolini, H.M.A. (2006) Avaliação Sensorial de Sorvete Formulado com Produto de Soro Ácido de Leite Bovino. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, SP. p.116-122.
- Singer, G.A., Hickey, D.A. (2003) Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*. V. 317, p. 39-47.
- Singh, J., Batra, N., Sobti, C.R. (2001) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus sp.* SSR1. *Process Biochemistry*, 36:781-785.
- Sinha, N., Satyanarayana, T. (1991) Alkaline protease by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.* 31, 425-430.
- Siso, M.I.G. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57:1-11.
- Skory, C.D. (2004) Lactic acid production by *Rhizopus oryzae* transformants with modified lactate dehydrogenase activity. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64: 237-242, 2004.
- Soares, I.A., Flores, A.C., Zanettin, A., Pin, H.K., Mendonça, M.M., Barcelos, R.P., Trevisol, L.R., Carvalho, R.D., Schauren, D., Rocha, L.M.S.C., Baroni, S. (2010) Identificação do potencial amilolítico de linhagens mutantes do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans*. *Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas*, 30(3): 700-705, 2010.
- Sookkheo, B., Sinchaikul, S., Phutrakul, S., Chen, S.T. (2000) Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Prot. Exp. Pur.* 20, 142-151.
- Souza, A.N., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32, 271-275.
- Souza, A.C.G., Sandi, D. (2001) Industrialização. In: *Maracujá: tecnologia de produção, pós-colheita, agroindústria, mercado*. Porto Alegre: Cinco continentes, 2001, p.305-343.
- Sottiez, P. (1985) *Produtos derivados das Fabricações Queijeiras*. p. 397-436. In: Louquet, F. M. *O Leite*. Portugal: 2º vol. Coleção Euroagro. Publicações Europa-américa.

- Stetter, K.O. (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*.452: 22-25.
- Talcoot, S.T., Percival, S.S., Pittet-Moore, J., Celoria, A.C. (2003) Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). *J. Agric. Food Chem.*, 51, 935-941.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2008) Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *Int. J. Mol. Sci.* 9, 1621-1651.
- Taherzadeh, M.J., Karimi, K. (2007) Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*, v. 2, n. 4, p. 707-738.
- Tari, C., Genckal, H., Tokatli, F. (2006) Optimization of a growth using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp.. L21. *Process Biochemistry*. 41:659-665.
- Tavares, V. B., Sivieri, K., Ceron, C.R., Silva, R., Trabuco, E., Lombardi, F. R., Gomes, E. (1998) Utilização do Resíduo Líquido de Indústria de Processamento de Suco de Laranja Como Meio de Cultura de *Penicillium Citrinum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. *Revista Química Nova*. 21:722-725.
- Togashi, C.K., Fonseca, J.B., Soares, T.N., Gaspar, A.R.E. (2007) Composição em ácidos graxos dos tecidos de frangos de corte alimentados com subprodutos de maracujá. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 6, p. 2063-2068.
- Tzanov, T., Calafell, M., Gübitz, G.M., Cavaco-Paulo, A. (2001) Bio-preparation of cotton fabrics. *Enzyme Microbiol. Technol.*, v. 29, n. 6-7, p. 357-362.
- Uenojo, M., Pastore, G.M. (2006) Isolamento e seleção de micro-organismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(3): 509-515.
- Ustáriz, F.J., Laca, A., García, L.A., Díaz, M. (2008) Fermentation conditions increasing protease production by *Serratia marcescens* in fresh whey. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*. Vol. 31, N°1, 79-89.
- Van Der Maarel, M.J., Van Der Veen, B., Uitdehaag, J.C., Leemhuis, H., Dijkhuizen, L. (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the α -amylase family. *Journal of Biotechnology*, 94, 137–155.
- Viotto, W.H., Machado, L.M.P. (2007) Estudo sobre a cristalização da lactose em doce de leite pastoso elaborado com diferentes concentrações de soro de queijo e amido de milho modificado. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, v.62, p.16-21.
- Vishwanatha, K.S., Appu Rao, A.G. (2010) Acid protease production by solid-state fermentation using *Aspergillus oryzae* MTCC 5341: optimization of process parameters. *J. Ind Microbiol Biotechnol.* 37:129–138.

- Wang, F., Podell, E.R., Zaug, A.J., Yang, Y., Baciú, P., Cech, T.R., Lei, M. (2007) The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, v.445, p.506-510.
- Wiseman, A. (1985) *Manual de Biotecnologia de las enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Yang, J.K., Shih, I.L., Tzeng, Y.M., Wang, S.L. (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microbiology Technology*, 26:406–413.
- Yang, S.T., Silva, E.M. (1995) Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate, milk lactose. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 78, n. 11, p. 2541-2562.
- Yoshida, C.M.P., Antunes, A.J. (2009) Aplicação de filmes proteicos à base de soro de leite. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 29(2): 420-430.
- Zamost, B.L., Nielsen, H.K., Starnes, R.L. (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. 8:71-82.
- Zhang, C., Kim, S.K. (2010) Research and Application of Marine Microbial Enzymes: Status and Prospects. *Mar. Drugs*. 8, 1920-1934.