

OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA A BASE DE SORO DE LEITE
E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO PARA PRODUÇÃO DE
PROTEASES POR *Bacillus* sp SMIA-2

CAMILA ROCHA DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

ABRIL – 2006

**OTIMIZAÇÃO DO MEIO DE CULTURA A BASE DE SORO DE
LEITE E ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO PARA PRODUÇÃO
DE PROTEASES POR *Bacillus* sp SMIA-2**

CAMILA ROCHA DA SILVA

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

Orientadora: Prof^a Meire Lélis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

ABRIL – 2006

**OTIMIZAÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA A BASE DE SORO DE
LEITE A ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO PARA PRODUÇÃO
DE PROTEASES POR *Bacillus* sp SMIA-2**

CAMILA ROCHA DA SILVA

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

Aprovada em 05 de abril de 2006

Comissão Examinadora:

Prof. Carlos Alberto Martins Cordeiros (D.Sc. Produção Vegetal) – Estácio de Sá

Prof^a. Rita da Trindade Ribeiro Nobre Soares (D.Sc. Zootecnia) – UENF

Prof^a. Karla Silva Ferreira (D.Sc. Ciências dos Alimentos) – UENF

Prof^a. Meire Lélis Leal Martins (Ph.D., Microbiologia) – UENF
(Orientadora)

Aos meus pais Hélio e Maria por nunca medirem esforços para que eu pudesse concretizar os meus sonhos e por me ensinar que com o ensino sempre podemos ser pessoas melhores.

Dedido

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por ser minha força, minha perseverança, minha superação de obstáculos, minha alegria e por me fazer ver o melhor caminho a trilhar mesmo os meus olhos estando fechados.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro pela oportunidade de realização do curso.

A Profa. Meire Lelis Leal Martins, pela orientação, pelo exemplo de profissionalismo, por sua dedicação e presença constante.

Aos Professores Carlos Alberto Martins Cordeiro, Rita Trindade Ribeiro Soares e Sílvia Menezes de Faria Pereira por terem aceitado a contribuir por este trabalho participando da banca de defesa e pelo carinho dispensado a mim sempre.

A todos os profissionais do LTA Ana Lúcia, Valdinéia, Lanamar, Profa. Karla e Prof. Éder, que de alguma forma especial contribuíram com a realização deste trabalho.

As estagiárias, Thamy, Julia, Simone, Sheyla, Daniele, pela preciosa ajuda e pela descontração no laboratório.

À minha estagiária Andréia, pela participação, pelo interesse e por confiar que eu poderia lhe transmitir ensinamentos.

Ao meu querido amigo Rodolfo, pela bonita caminhada que percorremos juntos e que termina agora com a concretização de que valeu muito a pena.

À minha querida “amiga-da-guarda” Raquel, pelo imenso carinho dedicado a mim, pela fundamental ajuda quando eu mais precisei e pela saudade que só os bons amigos sabem deixar (...).

Ao meus eternos amigos, Sheila, Rachel, Sandrinha, Luciana Araújo, Adrianinha, Cláudia, Juliana, Maria José, Erneida, Wellington e Juninho,... pois mesmo distantes sempre estiveram bem perto de mim, dando-me força e incentivo.

Ao meu amado amigo-irmão Abelardo, pela presença, pelo incentivo, pelos momentos alegres, pelos momentos tristes, pelas risadas, pelas lágrimas, ou seja, por estar presente na minha vida inteiramente e no meu coração.

Aos novos amigos Matheus, Luciana Coutinho, Luciana Konda, Takeshi, Chico, Kelly, Rosa, Arli, Denise, Cacá e família....

Aos meus pais, pelo que sou, pelo que eu pretendo ser; pelo exemplo de garra, de simplicidade. Agradeço o amor sem fronteiras, o olhar cheio de lágrimas ao me ver chegar e o me ver partir e por me ensinar que a família é a nossa base eterna.

À minha querida irmã Carol, um exemplo sempre de determinação, de amizade, de perseverança. Obrigada por cuidar de mim, deixando bem claro que sempre terei você ao meu lado no posto de irmã mais velha.

À querida tia Emília, isso sim é peça rara. Obrigada pela participação de me tornar o que sou e por sempre torcer pelo meu sucesso.

À minha amada Madrinha Luzia, agradeço por seus atos de pureza e pela minha criação sendo pra mim a minha segunda mãe.

À minha Gatinha “Galerinha” jamais precisarei ouvi-la para poder entendê-la, mesmo se ela pudesse falar, pois seu olhar sempre concretizou sua fala. Obrigada pela companhia.

A todos que mesmo com pequenos atos me ajudaram a concretizar este trabalho, meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
LISTAS DE TABELAS	viii
LISTAS DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Microrganismos termofílicos.....	3
2.2. Proteases.....	4
2.2.1. Classificação das proteases.....	5
2.2.2. Proteases microbianas.....	6
2.2.3. Proteases alcalinas.....	8
2.2.4. Propriedades das proteases alcalinas.....	9
2.2.4.1. Temperatura e pH.....	9
2.2.4.2. Efeito de estabilizadores/aditivos e íons metálicos.....	10
2.2.4.3. Especificidade por substrato.....	10
2.2.4.4. Parâmetros cinéticos.....	10

2.3. Otimização do meio de cultura para a produção de proteases.....	11
2.4. Utilização de resíduos agroindustriais na produção de proteases.....	12
2.5. Aplicação biotecnológica das proteases.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Microrganismo.....	16
3.2. Manutenção do microrganismo.....	16
3.3. Meio de crescimento.....	17
3.4. Preparo do Inóculo.....	17
3.5. Crescimento do microrganismo.....	18
3.6. Medida do crescimento.....	18
3.7. Determinação do pH.....	18
3.8. Ensaio enzimático.....	18
3.8.1. Determinação da atividade da protease.....	18
3.8.2. Determinação da proteína.....	19
3.9. Influência da fonte de carbono sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease.....	20
3.10. Influência da variação da concentração da fonte de carbono sobre o crescimento e atividade da protease.....	20
3.11. Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease.....	20
3.12. Influência da concentração do soro de leite sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease.....	21
3.13. Influência da concentração da água de maceração de milho sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease.....	21
3.14. Caracterização parcial da protease.....	22
3.14.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	22
3.14.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease.....	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Otimização dos componentes do meio de cultivo para o crescimento do microrganismo e para a produção enzimática.....	23
4.1.1. Efeito da fonte de carbono.....	23
4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio.....	30

4.1.3. Efeito da concentração do soro de leite.....	32
4.1.4. Efeito da concentração da água de maceração de milho.....	33
4.2. Caracterização parcial da protease.....	35
4.2.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	35
4.2.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease.....	37
5. RESUMOS E CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento e na atividade da protease do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivado durante 12 horas a 50 °C/180rpm.....	29
2. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na atividade da protease do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 com 12 horas de incubação a 50 °C/180rpm.....	31

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Efeito da ausência da fonte de carbono na composição do soro de leite no crescimento e na produção de protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 após 30 horas de incubação a 50 °C.....	24
2. Efeito da suplementação do soro de leite com lactose e maltose na concentração de 0,5% no crescimento e na atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2, após 30 horas de incubação a 50 °C.....	25
3. Efeito da concentração da maltose no crescimento e na produção da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 após 30 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5.....	25
4. Curva de crescimento (O), o pH (•) e produção de protease (△) por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio líquido contendo 1% de maltose.....	27
5. Curva de crescimento (△), pH (•) e atividade de protease (O) por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio líquido contendo 1% de maltose.....	28
6. Efeito da concentração do soro de leite no crescimento e na produção da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5.....	32
7. Efeito da concentração do soro de leite no crescimento e na produção da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5	34

8. pH ótimo (•) e estabilidade (◊) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 14h de incubação a 50 °C. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada após 1h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH. (100% atividade enzimática = 35,8 U/mgPTN)..... 35
9. pH ótimo (•) e estabilidade (◊) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 14h de incubação a 50 °C. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada após 1h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH. (100% atividade enzimática = 35,8 U/mgPTN)..... 37

RESUMO

SILVA, Camila Rocha; M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Abril, 2006; Otimização de um meio de cultura a base de soro de leite e água de maceração de milho para a produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2.; Orientadora Prof^a: Meire Lélis Leal Martins.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, com o objetivo de otimizar a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp. SMIA-2, quando cultivado num meio de cultura contendo soro de leite e água de maceração de milho.

A adição da maltose (0,5%) e da lactose (0,5%) individualmente as culturas líquidas contendo soro de leite, água de maceração de milho e sais minerais aumentou a secreção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2. Com a adição da maltose ao meio foram obtidos níveis de atividade da protease de 16,23 U/mgPTN, o que correspondeu a um aumento superior a dez vezes na atividade da enzima. A melhor concentração da maltose para a secreção da protease foi definida como sendo de 1%.

Um estudo do perfil da síntese da protease com o tempo de fermentação revelou que a enzima foi secretada seis horas após a inoculação do microrganismo no meio de cultura, alcançando a atividade máxima após doze horas de crescimento com níveis de 53 U/mgPTN.

Bacillus sp. SMIA-2 foi capaz de utilizar outras fontes de carbono além da maltose e lactose e secretar a protease no meio de cultura. Entretanto, o amido e a maltose foram as fontes que proporcionaram maiores atividades da protease, com níveis de 38,42 U/mgPTN e 35,83 U/mgPTN, respectivamente. A peptona (0,1%) foi a fonte de nitrogênio que ofereceu a máxima atividade específica da protease com níveis de 42,62 U/mgPTN. As demais fontes orgânicas e inorgânicas testadas, causaram uma redução na atividade da protease.

A concentração do soro de leite que proporcionou melhor atividade da protease foi 0,1%. Concentrações maiores que 0,15% causaram uma repressão na síntese da enzima. Em relação a concentração da água de maceração de milho no meio de cultura foi encontrado que 0,2% foi a que promoveu a melhor atividade da protease. Concentrações acima de 0,3% não influenciaram a atividade da protease e concentrações maiores que esta, causaram uma inibição da sua síntese.

Estudos sobre a caracterização da protease revelaram que a enzima mostrou uma atividade crescente entre 40° C e 70° C, onde a atividade atingiu o seu valor máximo. Acima de 70 °C ocorreu uma redução na atividade da enzima e a 90 °C e 100° C a protease perdeu cerca de 61,33% e 81,6% de sua atividade, respectivamente. A respeito à estabilidade térmica da protease foi observado que esta enzima reduziu sua estabilidade em temperaturas maiores eu 70 °C.

O pH ótimo da enzima foi 8,5. Em valores de pH maiores que 8,5 a atividade da enzima decresceu e a atividade foi reduzida em 17,2%. A estabilidade da α -amilase aumentou com o aumento do pH até em torno de 8,5. Em valores de pH acima de 8,5 a atividade da protease decresceu.

ABSTRACT

SILVA, Camila Rocha; M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense, Darcy Ribeiro; April, 2006. Optimization of a culture medium containing milk whey and corn steep liquor to production of protease by *Bacillus* sp. SMIA-2, Adviser: Meire Lélis Leal Martins.

The present work was carried out at the Laboratório de Tecnologia de Alimentos of the Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes-RJ with the objective of optimized the production of protease by thermophilic bacterium, *Bacillus* sp. SMIA-2, when growth in a medium containing milk whey, corn steep liquor and mineral salts .

The addition of maltose (0,5%) and lactose individually to the liquid cultures containing milk whey, corn steep liquor and mineral salts improved the synthesis of the protease by *Bacillus* sp. SMIA-2. With the addition of maltose to the medium were obtained levels of protease activity of 16.23 UmgPTN, which corresponded an increased of ten times in the enzyme activity. The best concentration of maltose to the synthesis of protease was established as been 1%.

Studies on the profile of synthesis of protease with the time revealed that the enzyme was produced six hours after the inoculation of the microorganism into the medium, reaching maximum activity after 12 hours of growth with levels of 53 U/mg PTN.

Bacillus sp. SMIA-2 was able to grow and synthesize the protease when cultivated in several carbon sources besides maltose and lactose. However, starch and maltose were the sources which provided higher activities of the protease with levels of 38,42 U/mgPTN e 35,83U/mgPTN, respectively. Peptone (0,1%) was the best nitrogen source to the synthesis of protease with activities of about 42,62 U/mgPTN. The other organic and inorganic nitrogen sources investigated, decreased the activity of the protease.

The milk whey concentration which provided better activity of the protease was 0.1%. Concentrations higher than 0.15% repressed the enzyme synthesis. Regarding the corn steep liquor concentration in the medium it was found that 0.2% was the best. Concentrations higher than 0.3% did not affect the enzyme activity and at higher concentrations the enzyme was inhibited.

Studies on the protease characterization revealed that the enzyme increased the activity at temperatures between 40 °C and 70 °C, where the activity reached its maximum. Above 70 °C occurred a reduction in the activity of the enzyme and at 90 °C and 100 °C the protease lost about 61 and 81% of its activity, respectively. Regarding the thermal stability of protease was observed that this enzyme reduced its stability at temperatures higher than 70 °C.

The optimum pH of protease was found to be 8.5. At values of pH higher than 8.5 the activity of the enzyme decreased and at pH the activity was reduced in 17.2%. The stability of the enzyme increased with the increase of pH until 8.5. In values of pH above 8.5 the protease activity decreased.

1. INTRODUÇÃO

As enzimas, que na sua maioria, são proteínas, com exceção somente a um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, são altamente especializadas. Atuam como catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos, sendo assim chamadas de catalisadores biológicos. Elas tornaram-se importantes, não apenas na Medicina, mas também na indústria química, no processamento de alimentos, na agricultura e nas atividades do dia-a-dia do lar, como na preparação de alimentos e na limpeza doméstica. Particularmente, a descoberta de enzimas termoestáveis vem revolucionando o mercado industrial, devido à vantagem na utilização de temperaturas mais elevadas sem com tudo causar desnaturação e perda da atividade enzimática. Assim sendo possível sua aplicação em inúmeras áreas biotecnológicas. Estas enzimas são principalmente hidrolases extracelulares, incluindo as proteases.

As proteases microbianas apresentam uma longa história comercial, sendo as enzimas mais utilizadas para aplicações biotecnológicas. Figuraram nos primeiros estudos de fisiologia, estrutura e mecanismos enzimáticos e vêm sendo utilizadas extensivamente nas indústrias de alimentos, laticínios e detergentes. Contudo, como as enzimas industriais comumente são utilizadas como

beneficiadoras, seu valor é limitado ao valor que elas atribuem ao produto final e este, freqüentemente, compete com outros do mesmo ramo. Apenas raramente, como ocorre no caso dos detergentes, o consumidor compra e utiliza as enzimas diretamente. Somado a isso, a maioria dos fornecedores ou mesmo usuários, ainda não produziram produtos únicos ou obtiveram vantagens de processos de propriedade. O resultado dessa combinação de fatores, é que apenas um número reduzido de enzimas industriais é utilizado em grandes volumes.

Devido à projeção das proteases em estudos fundamentais e ao seu interesse na indústria, não é surpresa que proteases de termófilos e hipertermófilos estejam atraindo especial interesse, ainda que com uma história mais recente. A descoberta de novas espécies termofílicas e a determinação de seqüências genômicas provêem uma rota para novas enzimas, com possibilidades de novas aplicações.

Considerando o grande interesse comercial pelas proteases, é importante a descoberta de novas proteases com características diferentes, a partir de fontes diversificadas. Neste sentido, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar um meio de cultura constituído de soro de leite e água de maceração de milho, para a secreção de proteases por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp. SMIA-2. Algumas características da enzima bruta foram também investigadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Microrganismos Termofílicos

Os organismos capazes de viver em altas temperaturas são chamados de termofílicos, termofílicos extremos e hipertermofílicos e tem fascinado os cientistas de todo mundo. Estes organismos são capazes de crescer em temperaturas acima de 50 °C e até próximo o ponto de ebulição da água. Podem ser isolados de ambientes com temperaturas naturalmente elevadas e são distribuídas por toda parte do mundo, além de serem encontradas em associação com locais com atividade tectônica (Brock, 1985).

Os microrganismos procarióticos são comumente divididos dentro de dois grandes reinos; Eubactérias e Archaeabaterias (Archaea). Um fato interessante é que em temperaturas maiores que 90 °C todas as espécies capazes de reproduzir são membros do reino Archaea. Conseqüentemente os componentes celulares dos Archaea são entidades notavelmente estáveis, e este fato é talvez melhor exemplificado pelas enzimas dos organismos que crescem em torno de 100 °C (Vieille *et al.*, 1996; Adams e Kelly, 1998; Jaenicke e Böhm, 1998; Hough e Danson, 1999).

Como as elevadas temperaturas desnaturam a maioria das enzimas e ácidos nucleicos dos microrganismos já estudados, uma considerável atenção foi focada no mecanismo pelos quais os termofílicos estabilizam suas macromoléculas (Grogan, 2000). Estudos com enzimas purificadas desses microrganismos têm demonstrado que uma variedade de substituições de aminoácidos pode estabilizar a proteína contra a desnaturação térmica via uma modificação sutil de sua estrutura secundária (Jaenicke e Böhm, 1998). Além disso, proteínas especializadas conhecidas como chaperones são produzidas por esses organismos, que auxiliam depois da sua desnaturação no re-enovelamento da proteína para sua forma nativa e restaurando assim sua função (Everly e Alberto, 2000).

A membrana celular de termófilos é composta de ácidos graxos saturados e estes promovem um meio hidrofóbico para a célula e mantém as células mais rígidas suportando assim temperaturas elevadas (De Rosa *et al.*, 1994).

Muitos dos hipertermofílicos archaea são de difícil cultivo. A temperaturas extremamente altas, eles freqüentemente requerem condições estritas de anaerobiose e fontes de energia inorgânica (Doolittle E Logsdon, 1998). Acredita-se que os microrganismos termofílicos são potencialmente uma boa fonte alternativa de enzimas termoestáveis (Brock, 1985 & Bolton *et al.*, 1997). Embora não haja evidências concretas para sugerir que as enzimas termoestáveis são necessariamente derivadas de organismos termofílicos, não obstante existe uma maior chance das proteínas termostáveis serem encontradas em bactérias termofílicas (Rahman *et al.*, 1994).

2.2. Proteases

Proteases são enzimas envolvidas na conversão de proteínas em aminoácidos e peptídeos (Leuchner E Antranikian, 1995). 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; Kalisz, 1988). 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.

Também chamadas de proteinases ou peptidases, as proteases são enzimas proteolíticas essenciais para a síntese de todas as proteínas, controlando o seu tamanho, composição, forma e por último a sua destruição. Conta-se com cerca de 2% do genoma humano e 1-5% dos genes dos organismos infecciosos (Puentes *et al.*, 2003).

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais com aplicações em diferentes indústrias em todo mundo, representando cerca de 60% do total de enzimas comercializadas (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 (Masse E Tilburg, 1983; Outtrup *et al.*, 1995; Wolff *et al.*, 1996; Gupta *et al.*, 2002b).

2.2.1. Classificação das proteases

As proteases como todas as demais enzimas seguem as normas de nomenclatura da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992). Sendo assim as proteases são enzimas da classe 3, as hidrolases e da subclasse 4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Estas enzimas constituem uma grande família (EC 3.4), dividida grosseiramente em dois grandes grupos: as endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-99) e exopeptidases (EC 3.4.11-19), de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia polipeptídica (Barret, 1994; Rao *et al.*, 1998).

Dependendo do local de clivagem da cadeia polipeptídica as proteases podem ser denominadas de exopeptidases ou endopeptidases. As exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas; próximo ao grupamento amino (aminopeptidases) ou carboxílico (carboxipeptidases) (Vermelho E Branquinho, 2005).

As aminopeptidases são de ocorrência bastante freqüente em uma grande variedade de espécies microbianas. Liberam resíduos simples de aminoácidos, dipeptídeos e tripeptídeos. Em geral são enzimas intracelulares, porém podem ser

expressas na forma extracelular. Já as carboxipeptidases liberam aminoácidos simples ou dipeptídeos (Priest, 1977; Vermelho E Branquinha, 2005).

As endopeptidases são caracterizadas por sua ação preferencial no interior das cadeias polipeptídicas em locais distantes tanto da extremidade carboxi terminal quanto da extremidade amino terminal. A presença de aminoácidos livres ou grupamento carboxílico exerce um efeito negativo sobre a atividade destas enzimas (Priest, 1977; Vermelho E Branquinha, 2005)

As proteases microbianas, dependendo se são ativas em condições neutras, ácidas ou alcalinas e natureza do seu centro ativo, são ainda classificadas em: (1) serina proteases (EC.3.4.21) quando têm um resíduo serina em seu centro ativo e são inibidas pelo PMSF e DFP; (2) cisteína proteases (EC.3.4.22) quando os grupamentos -SH são inibidos pelos reagentes tiol, metais pesados e reagentes oxidantes; (3) metalo-proteases (EC.3.4.24) quando têm cátions divalentes distintos e são inativadas por reagentes quelantes; e (4) aspártico proteases (EC.3.4.23) que podem ser inativadas por alquilação dos resíduos aspárticos (Moriyama, 1992; Gupta *et al.*, 2002b).

2.2.2. Proteases Microbianas

Devido a uma ampla diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas (Rao *et al.*, 1998). Além disso, as enzimas microbianas tendem a serem mais utilizadas que as enzimas de plantas e animais, devido apresentarem algumas vantagens como: grande variedade catalítica, obtida em elevadas quantidades com preço relativamente reduzido, possuir bastante homogeneidade e qualidade. São mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de obtenção é mais fácil e seguro (Wineman, 1985).

Os microrganismos contribuem com 2/3 da produção de proteases comercializadas no mundo. Existe uma longa lista de microrganismos produtores de proteases, porém um pequeno número é explorado comercialmente devido alguns possuírem características tóxicas e patogênicas. Um largo número de microrganismos pertencentes ao Reino Bactéria, Fungi, Leveduras e Actinomicetos é conhecido por produzir proteases alcalinas do tipo serina (Kumar

E Takagi, 1999). Porém muitos poucos microrganismos foram reconhecidos como produtores comerciais, sendo somente os microrganismos que produzem quantidades substanciais de enzimas extracelulares, os de maior importância industrial (Gupta *et al.*, 2002b).

As espécies de *Streptomyces* são exemplos de actinomicetos mais importantes industrialmente. Sua habilidade em produzir grandes quantidades de enzimas, como as proteases com uma variedade de substratos específicos, tem potencialmente aumentado o interesse pelo seu uso (Yeoman E Edwards, 1994).

O fungo *Conidiobolus coronatus* NCL 86.8.20 foi considerado por Phadatare *et al.* (1993) ser um bom produtor de protease alcalina. Segundo estes autores, esta enzima pode ser utilizada em substituição a subtilisin Carlsberg [grupo prototípico de serina protease bacteriana, mais especificamente de *B. licheniformis* (Jacobs *et al.*, 1985)] em uma mistura rancêmica de DL-fenilalanina e DL-fenilglicina. A produção de protease por esta cepa parece estar envolvida na descarga de conídios desse organismo.

Membros da família *Enterobacteriaceae* usualmente não secretam enzimas dentro do meio circundante, porém uma pequena execução é conhecida (Schmitz E Braum, 1985; Wandersman, 1989), sendo uma delas produtora de proteases extracelular, a *Serratia marcescens*. Vários autores têm citado a distribuição e multiplicidade das proteases entre diferentes cepas de *Serratia* e a caracterização das proteases extracelular de várias cepas de *S. marcescens* (Schmitz E Braum, 1985; Aiyappa E Harris, 1976; Miyazaki *et al.*, 1990), indicando que a maioria das cepas produz uma metalo-protease. Essa metalo-protease é produzida comercialmente devida sua importância econômica em algumas aplicações, especialmente como agentes antiinflamatórios.

Apesar do interesse por essas outras fontes, pesquisas conclusivas encontradas na literatura mostram que o gênero *Bacillus* sp. é significativamente a maior fonte comercial de proteases. Este fato deve-se a uma relativa facilidade de isolamento dos microrganismos deste gênero em fontes diversas, fazendo deles um foco de atenção na biotecnologia (Johnevelsy E Nail, 2001).

Os microrganismos do gênero *Bacillus* sp. são produtores específicos de proteases extracelulares (Markland & Smith, 1971; Godfrey & Reichelt, 1985). Eles podem ser cultivados sob condições extremas de temperatura e pH e

originar produtos que se tornam estáveis em uma ampla faixa de ambientes inadequados (Han & Damodaran, 1997).

Razak *et al.* (1997) e Rahman *et al.* (1994) reportaram que o *Bacillus stearothermophilus* produziu proteases termoestáveis à uma temperatura ótima de atividade de 60 °C. Gey E Unger (1995) reportaram outra cepa de *Bacillus stearothermophilus* TP26 como sendo produtores de proteases extracelulares com temperatura ótima de atividade a 75 °C.

Apesar de poucas citações sobre a atividade proteolítica de *Bacillus cereus*, Hayano *et al.* (1987) e Ghorbel *et al.* (2003) citam esses microrganismos como produtores de uma metalo-protease neutra resistente a solventes orgânicos.

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

2.2.3. Proteases Alcalinas

As proteases alcalinas (EC.3.4.21-24, 99) são definidas como sendo aquelas proteases ativas numa faixa de pH neutro a alcalino. Elas ou tem um centro serina (serina protease) ou são do tipo metalo (metalo-protease); sendo a serina protease alcalina o grupo mais importante de enzimas exploradas comercialmente (Gupta *et al.*, 2002b).

Existem alguns tipos de serina protease podendo ser citada a quimotripsina, carboxipeptidase, peptidase e subtilisina; sendo esta última geralmente de origem bacteriana e imensamente empregada na indústria de detergentes. Sua sequência de aminoácido e sua estrutura tridimensional a diferem das demais serina proteases. A tríade catalítica das subtilisinas consiste de aspartato, histidina e serina. São geralmente proteases extracelulares; e fatores como alta estabilidade e baixa especificidade de substrato fazem o sucesso do seu uso (Maurer, 2004).

A protease alcalina extracelular é uma manifestação de limitação de nutrientes no início da fase estacionária assim está associada pela transição do crescimento vegetativo para etapa de esporulação; para aqueles microrganismos que formam esporos. Sendo assim estas proteases alcalinas são imensamente produzidas durante a fase estacionária. Porém rendimento final de protease durante esta fase é também determinado pela biomassa produzida durante fase exponencial (Gupta *et al.*, 2002a).

2.2.4. Propriedades das Proteases alcalinas

As proteases alcalinas de vários microrganismos têm sido estudadas extensivamente e com base nas propriedades apresentadas elas podem ser utilizadas em diversas indústrias. A seguir será revisado algumas propriedades requeridas para a utilização dessas enzimas alcalinas na indústria de detergente.

2.2.4.1 Temperatura e pH

Em geral, atualmente todas as proteases usadas em detergentes são alcalinas e termoestáveis por natureza em um pH ótimo alto - pH de detergentes de lavanderia esta geralmente numa faixa de 8 a 12 - e tenha uma termoestabilidade variando a temperaturas de lavagem na faixa de 50 a 70°C. Por isso, a maioria das serina proteases tipo subtilisina disponíveis comercialmente serem também ativas em pH e temperaturas na faixa de 8 - 12 e 50 - 70°C respectivamente (Gupta *et al.*, 2002a).

Porém há uma recente tendência na exploração de proteases alcalinas que possam catalisar reações em água fria (Demirijani *et al.*, 2001) este fato permitiria a utilização dessas enzimas em temperaturas de lavagem mais baixas; podendo ser usadas diretamente na água do tanque comum sem a necessidade de aumenta da temperatura (Haki E Rakshit, 2003). Como por exemplo, KANNASE, fabricado por NOVOZYMES, é ativa em temperaturas na faixa de 10 a 20°C.

2.2.4.2. Efeito de estabilizadores/aditivos e Íons Metálicos

O uso comercial de protease alcalina se dá em altas temperaturas, desde modo melhorar a estabilidade térmica da enzima é particularmente vantajoso. A termoestabilidade pode ser aumentada ou por meio da adição de estabilizadores (PEG, álcool poliidríco, goma) na mistura de reação ou por meio da manipulação da estrutura terciária da enzima (Gupta *et al.*, 2002a).

O íon de Ca^{2+} é conhecido por desempenhar o principal papel de estabilização da enzima por aumentar a atividade e estabilidade térmica da protease alcalina em temperaturas elevadas (Kumar, 2002; Lee *et al.*, 1996).

Outros íons metálicos tais como Ba^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} também são usados como estabilizadores de proteases. (Johnvesly E Naik, 2001; Rattray *et al.*, 1995). Esses íons metálicos protegem a enzima contra a desnaturação térmica e desempenha um papel vital mantendo e confirmando ativa a enzima em altas temperaturas.

2.2.4.3. Especificidade por Substrato

As proteases alcalinas têm uma vasta especificidade de substrato e são ativas diante um número de substrato sintético e de proteínas naturais. Porém, a literatura conclusivamente sugere que essas enzimas são tão mais ativas diante caseína quanto diante de azocaseína, hemoglobina ou BSA. Elas também são específicas diante os resíduos de aminoácidos aromáticos e hidrofóbicos tais como tirosina, fenilalanina e leucina (Gupta, *et al.*, 2002a).

Friedrich *et al.* (1999) citam tipos específicos de proteases alcalinas, como, colagenase, elastase e queratinase que são ativas diante de substratos protéicos específicos com o colágeno, a elastina e a queratina respectivamente.

2.2.4.4. Parâmetros Cinéticos

Informações prévias sobre os parâmetros cinéticos das enzimas são de extrema importância. Para se preciso, propriedades cinéticas como K_m , $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat}

e E_a são importantes, porém não somente elas devem ser conhecidas, mas também a existência da enzima específica, do substrato específico e do meio específico é essencial para designar a reação da enzima ou quantificar as aplicações das enzimas em diferentes condições (Gupta *et al.*, 2002a).

Tanto os substratos complexos quanto os substratos sintéticos são usados para determinar os parâmetros cinéticos. Porém popularmente são mais utilizados os substratos sintéticos devido esses já definirem os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ convenientes para as enzimas (Kumar, 2002).

2.3. Otimização do Meio de Cultura para a Produção de Proteases

O maior foco para o aumento da produção de proteases está centrado na otimização do meio de cultura. (Johnevesly E Naik, 2001). Diferentes métodos de fermentação submersa foram usados para regular a síntese de proteases com estratégias que combinam culturas em batelada, contínua e quimiostática (Gupta *et al.*, 2002b; Hameed *et al.*, 1999), na tentativa de aumentar o rendimento na produção da enzima.

Segundo Ward (1986) a protease de *Bacillus* sp. foi produzida durante o final da fase exponencial. Mehrotra *et al.* (1999) relataram que protease alcalina também de um *Bacillus* sp. foi produzida do começo ao fim do processo de fermentação (4-36h), porém a produção da enzima foi maior com 20h de fermentação, compreendendo o final da fase exponencial de crescimento. Sendo assim, a secreção da protease por microrganismos é uma manifestação da escassez de nutrientes no início da fase estacionária; estando dessa maneira fortemente influenciada pelos componentes do meio. A variação na razão carbono/nitrogênio, presença de alguns açúcares e de nitrogênio facilmente metabolizáveis; e íons metálicos podem ser considerados como sendo um desses componentes (Beg *et al.*, 2002; Varela *et al.*, 1996).

O aumento da produção de protease está relacionado com o meio de cultura. Chauhan & Gupta (2004) reportaram que o elevado custo da produção de enzima é o principal obstáculo para sua aplicação industrial. Devido à promissora aplicabilidade dessas proteases, principalmente como constituintes em

detergentes, sua produção deveria ser intensificada utilizando para esse fim os meios de cultivos com baixos custos.

Quando comparado com meio complexo, o meio sintético apresenta muito mais vantagens incluindo um aumento na qualidade, melhoramento no controle e um melhor monitoramento do processo; além de uma melhoria na produção em escala, melhor recuperação, purificação e qualidade do produto (Zhang E Greasham, 1999).

A otimização do meio de cultura está associada com um extenso número de parâmetros fisiológicos e nutricionais, que afetam a produção de proteases. Dentre estes fatores incluem pH, temperatura, período de incubação e agitação, densidade do inóculo, efeito da fonte de carbono e de nitrogênio e cátions bivalentes (Gupta *et al.*, 2002a).

A suplementação do meio de cultura com uma solução de traços de metais aumentou o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a produção da protease. Esses metais protegem as enzimas contra a desnaturação térmica, possuindo um papel vital na manutenção de sua atividade catalítica (Gupta *et al.*, 2002a; Nascimento e Martins, 2004).

Uma vez definida a composição do meio de cultura, os detalhes do processo fermentativo relacionados a produção, são normalmente considerados componentes secretos, não sendo assim informações disponíveis ao público dominante (Maurer, 2004).

2.4. Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Proteases

Preocupações ambientais e econômicas exigem uma redução na geração dos resíduos oriundos do processamento de alimentos, e uma melhora no beneficiamento dos alimentos residuais pode originar novos produtos com valores agregados (Romero *et al.*, 2001).

Métodos que possam ser aplicados para o aproveitamento dos resíduos industriais têm sido cada vez mais procurados. A geração de resíduos agroindustriais constitui um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de alimentos, devido aos problemas ambientais oriundos do descarte destes produtos (Tavares *et al.*, 1998).

As proteínas fibrosas encontradas em produtos tais como, chifre, pena, unha e pêlos são abundantes e disponíveis como resíduos. Todos esses produtos que geram grandes quantidades de resíduos podem ser convertidos em biomassas, concentrados protéicos ou aminoácidos usando enzimas hidrolíticas de certos microrganismos (Atalo E Gashe, 1993).

Um limitado número de estudos tem sido reportado sobre o isolamento de microrganismos que são capazes de degradar penas de galinha, resíduo este gerado por indústrias processadoras de produtos avícolas. Porém Gessesse *et al.* (2003) citam a utilização de dois microrganismos, *B. pseudofirmus* e *Nesterkonia* sp. que são capazes de facilitar a hidrólise das proteínas presentes nas penas de galinhas que tem alto conteúdo protéico e podem assim serem utilizadas como uma grande fonte de proteínas para alimentação animal e para outras aplicações como, por exemplo, produção de proteases alcalinas.

O soro de queijos representa um importante problema ambiental devido ao seu elevado volume de geração e devido ao seu conteúdo de matéria orgânica. Várias possibilidades de exploração desse soro de queijo vêm sendo testadas há mais ou menos 50 anos, porém aproximadamente metade da produção mundial ainda hoje não é tratada sendo descartada como efluente (Siso, 1996).

O soro de queijo é o líquido remanescente da precipitação ou da remoção da caseína do leite durante a fabricação de queijos. Esse subproduto representa cerca de 85-95% do volume de leite e ele 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) (Kosikowski, 1979; Marwaha E Kennedy, 1988). Devido a 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).

A água de maceração de milho é produzida como um subproduto durante a produção de amido de milho. Esse subproduto tem sido usado como uma fonte barata de nutrientes microbianos essenciais para uma variedade de propósitos. Constitui uma fonte rica em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (Rivas *et al.*, 2004).

2.5. Aplicação Biotecnológica das Proteases

As proteases alcalinas contribuem no mundo todo com a principal parte de enzimas comercializadas. As proteases de bactérias encontram numerosas aplicações em vários setores industriais e diferentes companhias lançam vários produtos baseados na utilização dessas enzimas (Gupta *et al.*, 2002b).

Tradicionalmente, proteases microbianas são exploradas na indústria de alimentos, mesmo de forma involuntária como, por exemplo, nos primórdios da fabricação de vinho, pão e queijo (Haki E Rakshit, 2003; Gupta *et al.*, 2002b). Essas enzimas são usadas na preparação de hidrolisados protéicos de alto valor nutricional, tendo um importante papel na regulação da pressão sanguínea; sendo também usadas em formulações de alimentos para crianças, produtos de dieta terapêutica específica e na fortificação de sucos de frutas (Neklyudov *et al.*, 2000; Ward, 1985).

As proteases têm substituído às substâncias químicas que são utilizadas nas indústrias processadoras de couro, principalmente em virtude do risco à segurança e da poluição gerada ao meio ambiente por esses compostos. Então, por razões ambientais o biotratamento do couro está sendo preferido utilizando para esse fim enzimas proteolíticas, que gera várias vantagens ao processo, como por exemplo, controle mais fácil, redução nos resíduos e sendo assim ecologicamente correto (Andersen, 1998).

No manejo de resíduos industriais e domésticos, as proteases também têm um papel muito importante, pois ela solubiliza os resíduos proteínicos e assim ajuda a diminuir a demanda de oxigênio biológico dos sistemas aquáticos (Gupta *et al.*, 2002b).

Porém a utilização das enzimas na indústria de detergente é a de maior interesse. Pois sua habilidade e eficiência em ajudar na remoção de manchas de proteínicos de forma uniforme não pode ser comparada com a tecnologia desses detergentes convencionais. A história da utilização de enzimas em detergentes, teve início por volta de 1914, quando foi produzido o primeiro detergente enzimático que consistia de carbonato de sódio adicionado de extrato bruto de enzimas pancreáticas. Porém, somente em 1956 surgiu o primeiro detergente com enzimas microbianas cujo nome foi Bio-40 e em 1963 uma protease alcalina, a alcalase, foi incorporada na formulação de detergente em pó,

o qual recebeu o nome de Biotex e foi comercializado pela indústria Novo Industry S/A (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002b). A partir daí o surgimento de novas tecnologias e novas pesquisas não param de ser realizadas com intuito de descobrir novos produtores de proteases e novas propriedades que levem sempre a obtenção de um detergente mais eficaz.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi um *Bacillus* sp. SMIA-2, uma bactéria termofílica. Seu isolamento foi realizado 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 (Nunes e Martins, 2001). Comparações com as seqüências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. AK1.

3.2. Manutenção do Microrganismo

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (triptona 20g/L; NaCl 10 g/L; extrato de levedura 10 g/L; ágar 20 g/L e água 1L), sob temperatura de refrigeração (7 °C).

3.3. Meio de Crescimento

Para o crescimento do microrganismo foram utilizados os meios de cultura com a seguinte composição (g L⁻¹):

Meio 1: soro de leite (70% de proteína, 3% de umidade, 15% de lactose, 2% de gordura e 10% de sais minerais) 1,0; água de maceração de milho 3,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 0,87; CaCl₂ 0,29; ZnO-2,03x10⁻³; FeCl₃.6H₂O-2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O-1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O-8,5x10⁻⁵; CoCl₂.6H₂O-2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O-2,5x10⁻⁴; CaCl₂-2,2x10⁻³ e H₃BO₃-3,0x10⁻⁴.

Meio 2: soro de leite (81% de proteína, 4% de umidade, 5% de gordura e 10% de sais minerais) 1,0; água de maceração de milho 3,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 0,87; CaCl₂ 0,29; ZnO-2,03x10⁻³; FeCl₃.6H₂O-2,7x10⁻²; MnCl₂.4H₂O-1,0x10⁻²; CuCl₂.2H₂O-8,5x10⁻⁵; CoCl₂.6H₂O-2,4x10⁻³; NiCl₃.6H₂O-2,5x10⁻⁴; CaCl₂-2,2x10⁻³ e H₃BO₃-3,0x10⁻⁴.

Os meios foram preparados utilizando-se água destilada e esterilizados em autoclave à 121 °C, por 15 minutos. O pH final ajustado para 7,5 com NaOH 2M, antes da esterilização.

3.4. Preparo do Inóculo

O inóculo foi preparado germinando o microrganismo em placas de Petri contendo o meio TSY anteriormente descrito. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C. Após 18 horas de cultivo, 5 mL do respectivo meio de crescimento foram pipetados para dentro das placas e as células ressuspensas e retiradas utilizando-se uma pipeta estéril. Estas células então, foram inoculadas em frascos Erlenmeyer, contendo o mesmo meio de crescimento e, incubadas por 12 horas a 50 °C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm.

3.5. Crescimento do Microrganismo

Os meios descritos anteriormente foram inoculados com 2 mL da cultura de véspera (pré-inóculo), volume suficiente para que a absorbância inicial da cultura fosse igual a 1,0, e novamente incubado em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm, e à temperatura de 50 °C.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, sendo cada uma constituída de 25 mL de meio de cultura em frasco erlenmeyer de 250mL. Em intervalos de tempos pré-determinados, foram retiradas amostras para a determinação do crescimento, pH e atividade enzimática.

3.6. Medida do Crescimento

O crescimento celular foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 600nm.

3.7. Determinação do pH de crescimento

As variações dos valores de pH durante o crescimento celular foram determinadas utilizando-se o pHmetro da marca WTW pH 330.

3.8. Ensaio Enzimático

3.8.1. Determinação da atividade da protease

Alíquotas do meio de crescimento foram centrifugadas (4500g/15min) a 4 °C em uma centrífuga modelo Hermle Z 382 e o sobrenadante, livre de células, utilizado para determinação da atividade enzimática.

A atividade da protease foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15%. O substrato utilizado para

essa determinação foi a solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão TRIS-HCl (pH 8,5). Uma amostra de 0,5 mL do sobrenadante foi colocada em 1 mL de 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 15000g/5min a 4 °C (Hermle Z 382) e o sobrenadante transferido para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de NaOH 1,0N, conforme descrito por Janssen *et al.*, (1994). Os tubos brancos foram incubados em banho-maria somente com o substrato e só depois de paralisada a reação com o TCA que o extrato enzimático foi adicionado. A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando comprimento de onda de 420nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420nm igual a 0,1 em 60 minutos.

3.8.2. Determinação da proteína

A dosagem de proteína nos filtrados da cultura foi determinada pelo método de Lowry, conforme modificações propostas por Peterson (1977), usando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os reagentes utilizados foram os seguintes: Reagente A (carbonato de sódio 20 g/L; NaOH 2N 50 mL/L; tartarato de sódio e potássio 0,2 g/L), Reagente B ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 g/L), Reagente C (50 partes do Reagente A e uma parte do Reagente B).

A mistura de reação foi constituída de 40 µL da amostra, 360 µL de tampão fosfato 50 mM pH 6,5 e 2000 µL da solução C. Esta mistura foi agitada vigorosamente e após o repouso da mesma por 15 minutos, foi adicionado 200 µL do reagente de Folin. A mistura foi agitada novamente e em seguida deixada em repouso por mais 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado com o controle exceto, que a amostra foi substituída por tampão.

A coloração desenvolvida foi medida através de espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240 utilizando comprimento de onda de 750nm.

3.9. Influência da Fonte de Carbono sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease

Para este estudo o microrganismo foi cultivado no *Meio 2* acrescido individualmente das seguintes fontes de carbono à 1,0%: amido, frutose, galactose, glicose, lactose, maltose e sacarose.

As soluções de açúcares foram esterilizadas separadamente em autoclave à 121 °C por 15 minutos e adicionadas posteriormente ao meio de crescimento de forma asséptica em capela de fluxo laminar.

As culturas foram incubadas por 30 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm. Após este período, a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.10. Influência da Variação da Concentração da Fonte de Carbono sobre o crescimento e atividade da protease

Após a definição da melhor fonte de carbono para a secreção da protease foi avaliada qual a melhor concentração desta fonte para o crescimento e para a atividade da enzima. O microrganismo foi cultivado no *Meio 2* contendo a fonte de carbono selecionada nas seguintes concentrações: 0,0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5 e 2,0%.

3.11. Influência da Fonte de Nitrogênio sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease

A influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade da enzima foi investigada cultivando-se o microrganismo no *Meio 2* contendo a melhor fonte de carbono para a secreção da protease e acrescido individualmente das seguintes fontes de nitrogênio: peptona, 0,1% e 0,5%; extrato de levedura, 0,5%; extrato de carne, 0,5%; caseína, 0,5%; citrato de amônio, 1,0%; KNO₃, 1,0%; NH₄NO₃, 1,0%; NH₄Cl, 1,0%; (NH₄)₂SO₄, 1,0% e (NH₄)₂HPO₄, 1,0%.

As soluções nitrogenadas e a fonte de carbono foram esterilizadas separadamente em autoclave a 121 °C por 15 minutos e adicionadas posteriormente ao meio de crescimento de forma asséptica em capela de fluxo laminar. As culturas foram incubadas por 30 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.12. Influência da Concentração do Soro de Leite sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease

O microrganismo foi cultivado no *Meio 2* contendo a fonte de carbono e a fonte de nitrogênio selecionada e o soro de leite foi avaliado nas seguintes concentrações: 0,025; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20 e 0,25%. Após a esterilização e inoculação do meio, a cultura foi incubada por 12 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.13. Influência da Concentração da Água de Maceração de Milho sobre o crescimento do microrganismo e atividade da protease

O microrganismo foi cultivado no *Meio 2* contendo a fonte de carbono e de nitrogênio selecionada, melhor concentração do soro de leite e água de maceração de milho foi avaliada nas diferentes concentrações: 0,05; 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50 e 0,70%. Após a esterilização e inoculação do meio, a cultura foi incubada por 12 horas a 50 °C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 180 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.14. Caracterização Parcial da Protease

3.14.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A influência do pH sobre a atividade enzimática foi avaliada numa faixa de 6,0 a 10,0 com intervalo de 0,5 unidades. No preparo do substrato foram utilizados os seguintes tampões: fosfato de sódio (pH 6,0-7,5), tampão TRIS/HCl (pH 8,0-9,0) e tampão glicina-NaOH (9,5-10). Os valores de pH das misturas foram ajustados com NaOH e HCl 1N.

O pH ótimo foi determinado utilizando-se o substrato, azocaseína 0,2%, nas diferentes soluções de pH (6,0 – 10,0). Posteriormente 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1 mL do substrato e incubado em banho-maria a 70 °C por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme já descrito no item 3.8.

A estabilidade da protease a diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o sobrenadante sem o substrato nas soluções tamponantes anteriormente descritas por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da protease foi determinada conforme descrito no item 3.8.

3.14.2. Efeito da Temperatura na atividade e estabilidade da protease

A determinação da temperatura ótima foi realizada incubando-se a mistura de reação em temperaturas que variaram de 40 a 100 °C, com intervalos de 10 °C. Depois de 10 minutos de incubação em cada temperatura a atividade enzimática foi analisada, conforme descrito no item 3.8.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando a enzima em temperaturas que variaram de 40 a 100 °C com intervalos de 10 °C por 1 horas. Após o período de incubação a atividade residual foi analisada reincubando a amostra na temperatura ótima da enzima, determinada anteriormente, por 10 minutos e a atividade enzimática foi obtida conforme o item 3.8.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização dos componentes do meio de cultivo para o crescimento do microrganismo e para a produção enzimática

4.1.1. Efeito da fonte de carbono

O cultivo de *Bacillus* sp. SMIA-2 no meio contendo soro de leite, água de maceração de milho (Meio 2) causou uma redução de 94,29% na atividade da protease, como mostrado na Figura 1. Este resultado confirma a necessidade de suplementação do meio de crescimento com uma fonte de carbono para a secreção da protease. Vários autores citam as fontes de carbono como um dos principais parâmetros a serem observados para um favorecimento na produção de proteases (Banerjee, *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002a; Johnvesly e Naik, 2001; Mabrouk *et al.*, 1999). A presença de uma fonte de carbono proporciona um aumento do número celular, considerado de fundamental importância no rendimento da produção enzimática.

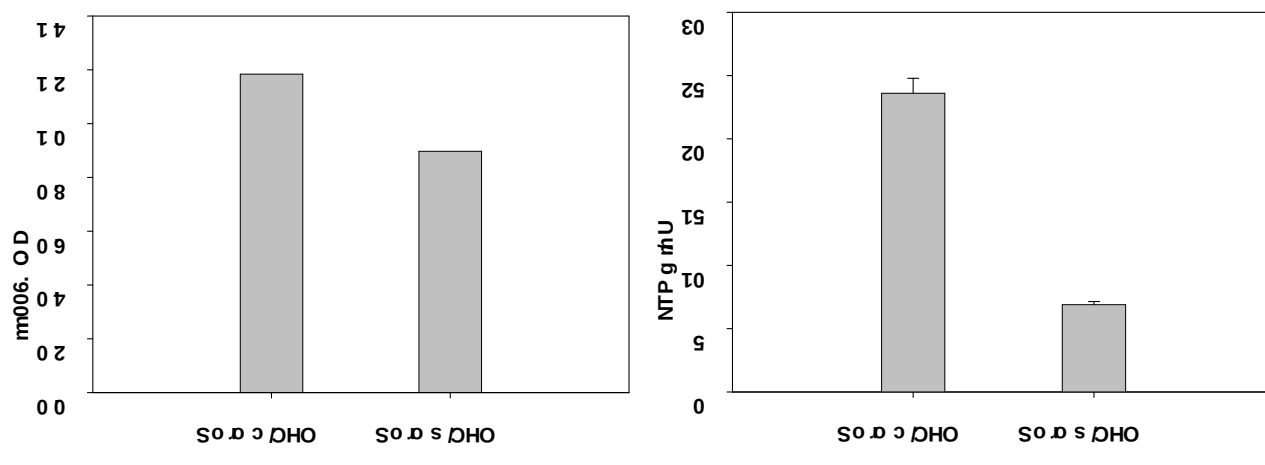


Figura 1 – Efeito da ausência da fonte de carbono na composição do soro de leite no crescimento e na produção de protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 30 horas de incubação a 50 °C.

O meio de cultura contendo o soro de leite ausente de lactose (Meio 2) foi suplementado com duas fontes de carbono, maltose (0,5%) e lactose (0,5%), objetivando aumentar a atividade da protease. De acordo com os resultados apresentados na Figura 2 houve um aumento na atividade da protease, quando estas duas fontes de carbono foram adicionadas ao meio de cultura. Com a adição da maltose e da lactose ao meio de cultura foram obtidas atividades da protease de 16,23 U/mgPTN e de 2,03 U/mgPTN, respectivamente. Portanto, a maltose comparada à lactose, mostrou ser uma melhor fonte de carbono para a secreção da protease.

A adição da maltose ao meio de cultivo proporcionou um aumento superior a dez vezes na atividade da enzima quando comparado com o meio sem fonte de carbono (Figura 1). Resultados similares sobre o efeito da maltose na produção de protease também foram mostrados por Johnvesly e Naik (2001). Segundo estes autores, a maltose proporcionou um aumento cerca de duas vezes maior que a lactose na produção da protease. Nascimento e Martins (2004) também mostraram um acréscimo da atividade da protease, quando o meio foi suplementado com maltose em comparação com a lactose.

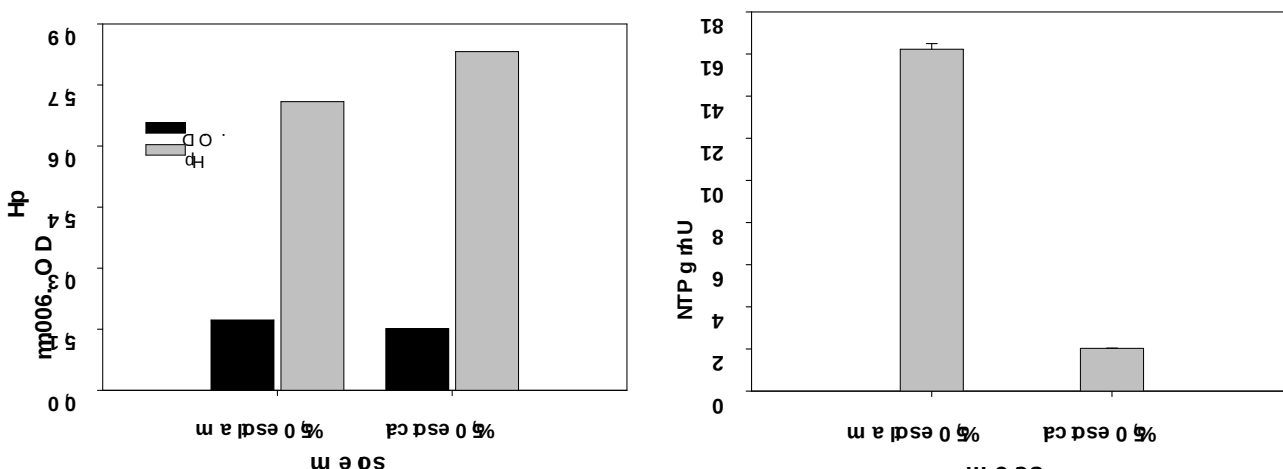


Figura 2 – Efeito da suplementação do soro de leite com lactose e maltose na concentração de 0,5% no crescimento e na atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2, após 30 horas de incubação a 50 °C.

Uma vez que a maltose demonstrou ser a melhor fonte de carbono em comparação à lactose, foi então verificado qual a concentração desta fonte que proporcionaria o melhor crescimento do microrganismo e a melhor atividade da protease. Os resultados deste experimento estão mostrados na Figura 3.

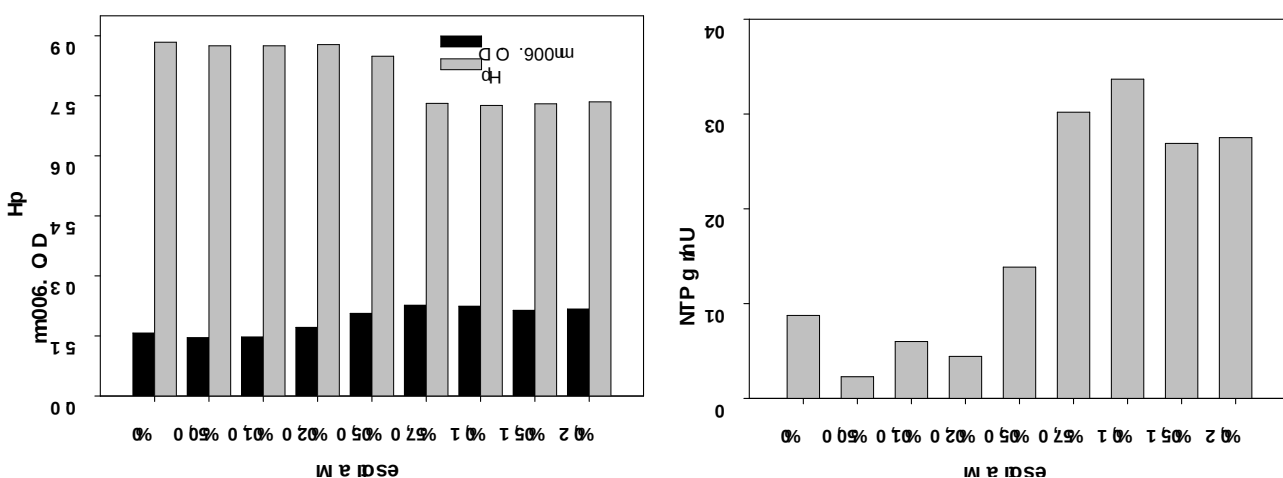


Figura 3 - Efeito da concentração da maltose no crescimento e na produção da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 30 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5.

A concentração de 1% de maltose foi a que proporcionou melhor crescimento e maior atividade da protease. Em estudos similares, vários autores constataram que a concentração para diferentes fontes de carbono ficava em torno de 1%. Gessesse e Gashe (1997) avaliaram o efeito da concentração de glicose na atividade de protease de *Microbacterium*. Segundo eles, a melhor concentração desta fonte de carbono para a secreção da enzima foi na faixa de 1-3% de glicose.

Johnvesly e Naik (2001) utilizaram a concentração de 1% para diferentes fontes de carbono para avaliar a produção de protease de *Bacillus* sp. JP-99. Mehrotra *et al.* (1999) também utilizaram a concentração de 1% para diferentes fontes de carbono, para avaliar o seu efeito na produtividade de protease de um isolado alcalofílico, identificado com *Bacillus* sp.

Estabelecido a concentração de 1% de maltose como sendo a melhor para a secreção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2, foi determinado o perfil da síntese da enzima no decorrer do processo fermentativo. Assim, a atividade da protease foi determinada durante o crescimento do microrganismo no Meio 2 por 50 horas a 50° C (Figura 4).

O crescimento foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura, porém a secreção da enzima foi observada após 6 horas de incubação. A fase exponencial de crescimento do microrganismo foi observada durante as primeiras 12 horas de incubação. Após esse tempo foi observado que a velocidade de crescimento reduziu marcando assim a fase estacionária da cultura. De acordo com Singh *et al.* (2003) essa secreção mais tardia da enzima em relação ao crescimento deve-se ao fato que a produção enzimática necessita de uma massa mínima de células para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas.

A produção máxima da protease foi observada com 12 horas de crescimento com níveis de 53 U/mgPTN. Com um tempo de 24 horas de incubação uma redução de cerca de 30% na atividade da enzima foi observada e os níveis foram diminuindo com o aumento do tempo de crescimento.

Gupta *et al.* (2002b) relataram que espécies de *Bacillus* produzem proteases extracelulares durante o final da fase exponencial e início da fase estacionária. Ward (1985), cita que a função destas enzimas ainda não é bem

conhecida, porém sua produção está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação.

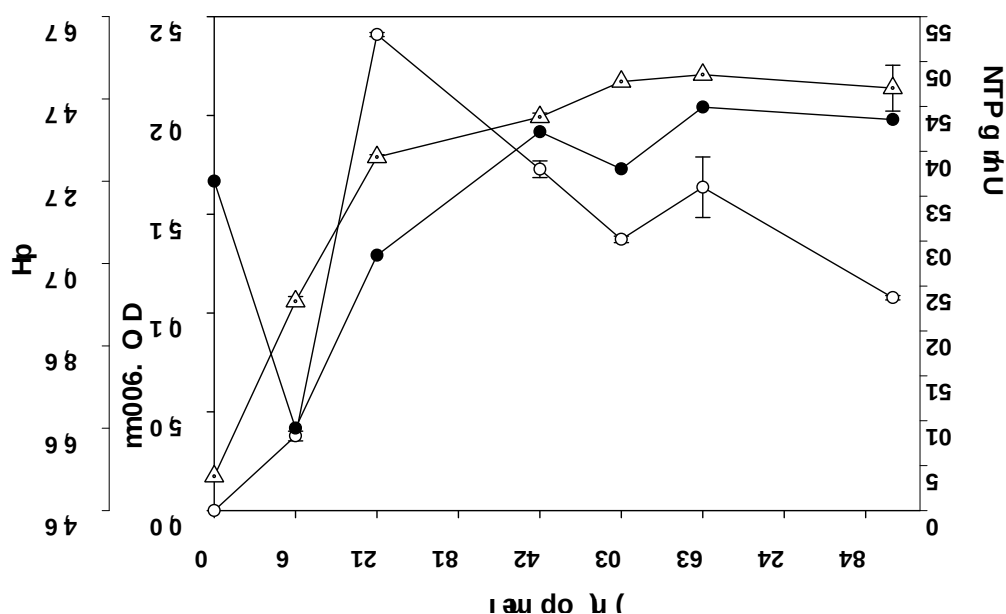


Figura 4 - Curva de crescimento (Δ), o pH (●) e produção de protease (○) por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio líquido contendo 1% de maltose.

O perfil do pH também é mostrado na Figura 4. Observa-se uma queda no pH da cultura de 7,2 para 6,6 durante as primeiras 6 horas de incubação. Entretanto, o pH do meio de cultura aumentou gradativamente para 7,32 depois de 24 horas permanecendo praticamente sem alterações até 50 horas de fermentação. Rahman *et al.* (2005) observaram um perfil de pH similar estudando a produção de protease de *Pseudomonas aeruginosa* strain K. Os autores atribuem essa queda inicial do pH a uma possível produção de ácidos durante a fase de crescimento bacteriano e devido principalmente à fermentação da fonte de carbono, onde é mais intensa nesse período. A elevação do pH eles atribuem a utilização dos ácidos orgânicos ou produção de componentes alcalinos durante esse período de tempo mais prolongado. Já 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. Devido a essa relação entre a síntese de protease e a utilização de compostos nitrogenados, a variação do pH é utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção de proteases, como o início e o final de sua síntese.

Um perfil mais detalhado da síntese da protease no decorrer do processo fermentativo foi conduzido. O início da secreção da protease ocorreu 2 horas após o início da fermentação (Figura 5), ou seja, quatro horas antes do que havia sido observado anteriormente. No intervalo de 10-16 horas de incubação, os níveis de atividade da protease alcançaram valores da ordem de 39,65 U/mgPTN, com atividade máxima sendo observado com 14 horas de incubação. Após este período de crescimento observou-se um decréscimo na atividade da enzima, semelhante ao que foi observado nos resultados apresentados na Figura 4. Este decréscimo na atividade da enzima sugere que a produção da protease é concomitante ao crescimento e ao diminuir ou cessar a atividade metabólica também ocorre à diminuição da produção da protease. O perfil do pH foi também semelhante ao já observado na Figura 4.

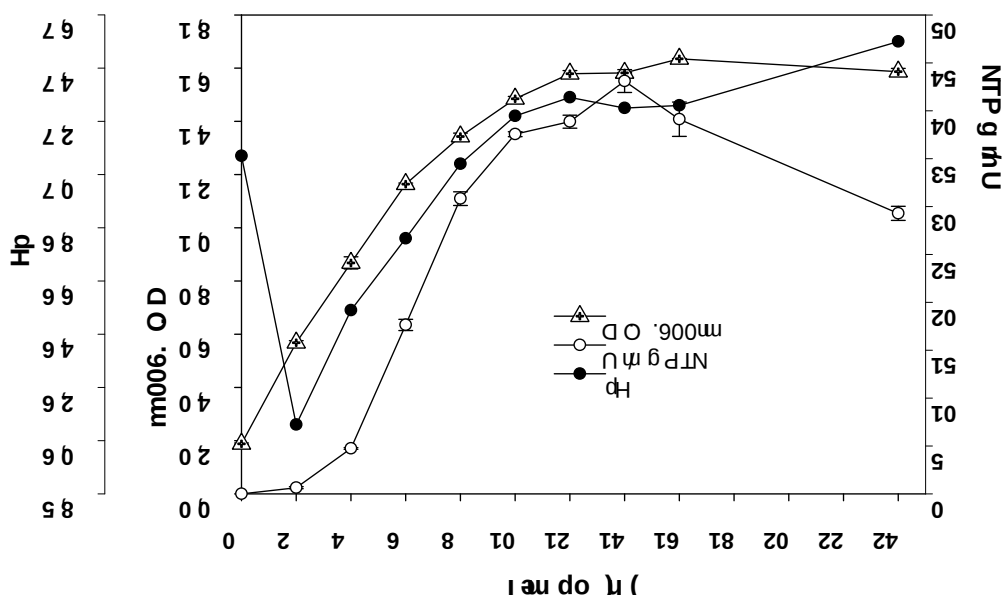


Figura 5 - Curva de crescimento (Δ), pH ($\bullet$) e atividade de protease (O) por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio líquido contendo 1% de maltose.

A fim de avaliar a influência de diferentes fontes de carbono sobre a atividade da protease, o microrganismo foi cultivado no Meio 2, substituindo a maltose por outras fontes de carbono. O *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de utilizar outras fontes de carbono além da maltose e lactose e secretar a protease, como mostrado na Tabela 1. O amido e a maltose foram as fontes de carbono que proporcionaram maiores atividades da protease, com níveis de 38,42 U/mgPTN e 35,83 U/mgPTN, respectivamente. Frutose, galactose e glicose foram consideradas boas fontes de carbono para a secreção da protease pelo microrganismo. Os níveis de atividade obtidos para estas três fontes de carbono foram 25; 24,32 e 22,15 U/mgPTN respectivamente. Já a lactose e sacarose foram as fontes de carbono que proporcionaram os menores níveis de atividade da protease.

Tabela 1 - Efeito de diferentes fontes de carbono no crescimento e na atividade da protease do *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado durante 12 horas a 50 °C/180rpm.

Fontes de Carbono*	Densidade Ótica – DO _{600nm}	Atividade Enzimática U/mg Proteína
Amido	1,578	38,42 ± 0,71
Frutose	1,334	25,00 ± 1,01
Galactose	1,520	24,32 ± 0,68
Glicose	1,219	22,15 ± 0,46
Lactose	1,388	15,51 ± 1,04
Maltose	1,550	35,83 ± 0,50
Sacarose	1,081	12,59 ± 0,75

*Todas as fontes de carbono foram usadas na concentração de 1%

Tari *et al.* (2006) em um estudo similar, demonstraram que *Bacillus* sp. L21 obteve uma máxima atividade específica de protease quando utilizou maltose no meio de crescimento. Mabrouk *et al.* (1999) verificaram que lactose e frutose aumentaram a produtividade da enzima do *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 e que amido de milho causou uma redução de 75% na produtividade da enzima.

Apesar da glicose ter-se apresentado como uma razoável fonte de carbono para a produtividade da protease, alguns pesquisadores discutem os efeitos inibitórios que ela pode causar. Gibb *et al.* (1989) citam que quando glicose e extrato de levedura foram utilizados em elevadas concentrações proporcionaram

um excelente meio de crescimento para *Straptomyces* C5-A13, porém inibiram a produção da protease.

Considerando todos esses fatores e também um custo duas vezes menor, a maltose foi escolhida como a melhor fonte de carbono para a secreção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2.

4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio

Os microrganismos de forma geral dependem da disponibilidade tanto da fonte de carbono como também da fonte de nitrogênio. Eles utilizam o nitrogênio na produção de aminoácidos, ácidos nucleicos, componentes da membrana celular e proteínas. Como a natureza da fonte de nitrogênio pode afetar diretamente a produção de proteases, a peptona do meio de cultura foi substituída por outras fontes de nitrogênio, tanto orgânico como inorgânico. Os resultados da atividade da protease e do crescimento do microrganismo são mostrados na Tabela 2.

As fontes de nitrogênio, orgânico e inorgânico, que foram testadas proporcionaram um ótimo crescimento do microrganismo, com exceção da caseína (0,5%) e do citrato de amônio (1,0%), que inibiram o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2. A peptona (0,1%) foi a fonte de nitrogênio orgânica que ofereceu a máxima atividade específica da protease com níveis de 42,62 U/mgPTN. As demais fontes orgânicas e inorgânicas testadas, causaram uma redução na atividade da protease. Entre as fontes inorgânicas, o nitrato de potássio foi o que apresentou melhor atividade da protease (18,23 U/mgPTN), porém este resultado foi cerca de duas vezes inferior quando comparado com o resultado encontrado para a atividade da enzima no meio sem fonte de nitrogênio (controle). Ming Chu *et al.* (1992) relataram que alguns componentes nitrogenados orgânicos e inorgânicos podem ter efeitos adversos na produção de enzimas, com os sais amônios sendo os mais inibitórios. Por outro lado, Chauhan e Gupta (2004) observaram que a peptona foi uma das fontes de nitrogênio orgânico que proporcionou maior indução da protease de *Bacillus* sp. RGR-14. Segundo estes mesmos autores, as fontes de nitrogênio orgânico mais complexas

proporcionam maior produtividade enzimática que as fontes de nitrogênio inorgânico mais simples.

Patel *et al.* (2005) observaram que as fontes de nitrogênio inorgânico promoveram um baixo favorecimento tanto para o crescimento como para secreção da enzima de um *Bacillus* sp. haloalcalofílico e que somente nitrato de potássio e cloreto de amônio proporcionaram um bom crescimento e produção da enzima. Segundo Singh *et al.* (2004), a concentração inicial da fonte de nitrogênio deve ser otimizada, uma vez que a secreção da protease pode ser induzida ou reprimida por peptídeos e aminoácidos presentes no extrato de levedura e biopeptona, dependendo da sua natureza e da sua concentração.

Tabela 2 - Efeito de diferentes fontes de nitrogênio no crescimento e na atividade da protease do *Bacillus* sp. SMIA-2 com 12 horas de incubação a 50 °C/180rpm.

Fontes de Nitrogênio	Densidade Ótica - DO _{600nm}	Atividade Enzimática U/mg Proteína
Ausente de Fonte	1,513	33,42 ± 1,01
Caseína (0,5%)	0,894	14,31 ± 0,58
Extrato de Carne (0,5%)	1,479	9,04 ± 0,30
Extrato de Levedura (0,5%)	1,512	2,17 ± 0,02
Peptona (0,1%)	1,484	42,62 ± 2,03
Peptona (0,5%)	1,570	5,63 ± 0,18
Citrato de Amônio (1,0%)	0,142	0,30 ± 0,04
KNO ₃ (1,0%)	1,698	18,23 ± 0,46
NH ₄ NO ₃ (1,0%)	1,538	4,67 ± 0,22
NH ₄ Cl (1,0%)	1,415	0,08 ± 0,15
(NH ₄) ₂ SO ₄ (1,0%)	1,335	0

O aumento da concentração da peptona de 0,1% para 0,5% proporcionou uma redução de 86,76% na atividade da protease. Em estudo similar, Nascimento (2004) também observou esse decréscimo na atividade da protease ao utilizar uma maior concentração de peptona no meio de cultura. Ao utilizar concentrações mais elevadas de triptona para favorecimento da produção de protease de *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20), Phadatare *et al.* (1993) não observaram nenhum incremento significativo na produção desta enzima. Banerjee *et al.* (1999) relatam que peptona foi a pior fonte de nitrogênio orgânico para a produção de

protease alcalina de *Bacillus brevis*. Porém os autores utilizaram uma concentração de 1% para todas as fontes testadas.

4.1.3. Efeito da concentração do soro de leite

Uma das maiores desvantagens da utilização das proteases em larga escala é o custo de sua produção. O uso de meios de cultivo mais econômicos é, portanto, de grande importância para a redução dos gastos envolvidos com a produção destas enzimas. Neste trabalho, foi utilizado um meio de cultura contendo o soro de leite, um resíduo da indústria de laticínios, para o crescimento do microrganismo e secreção da protease. A fim de definir a melhor concentração deste resíduo, sua quantidade foi variada no meio de cultura e os resultados deste experimento estão mostrados na Figura 6.

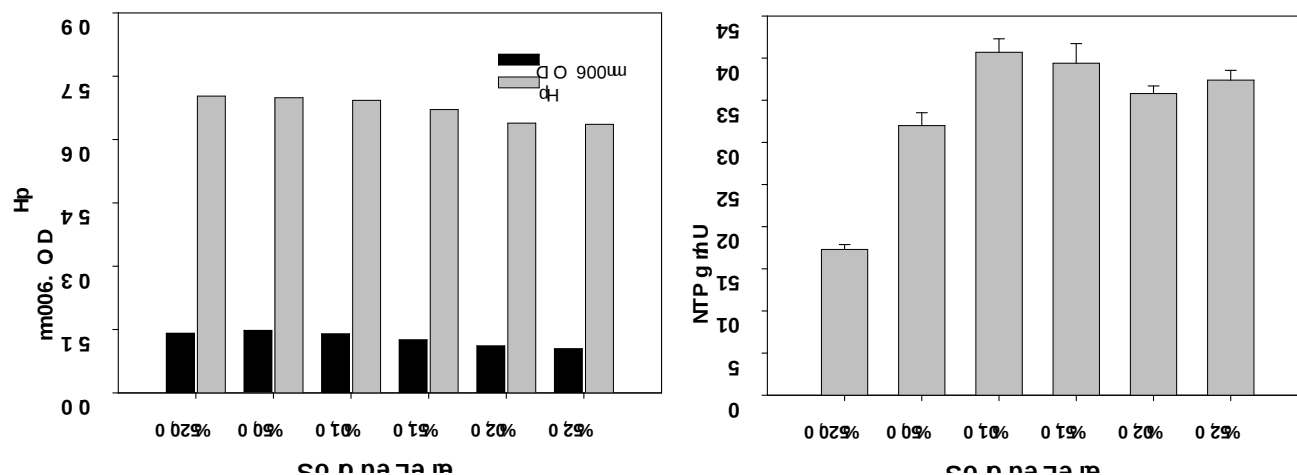


Figura 6 - Efeito da concentração do soro de leite no crescimento e na produção da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5.

A concentração do soro de leite que proporcionou melhor atividade da protease foi 0,1% com níveis de 40,7 U/mgPTN. O aumento na concentração do soro de leite para 0,15% não contribuiu efetivamente para o aumento na produção da protease, tendo resultados bastante similares aos resultados encontrados para

a concentração de 0,1%. Em concentrações maiores foi verificado uma repressão na produção. Não foram observadas grandes alterações no crescimento e nos valores do pH nas diferentes concentrações do soro de leite testadas.

Feijoo *et al.* (1999) utilizaram três diferentes tipos de soro de queijo com o objetivo de substituir fontes de carbono e nitrogênio mais caras. Esses pesquisadores constataram que o soro de queijo foi uma ótima fonte alternativa para a produção de peroxidase manganese de *Bjerkandera* sp. BOS55 a um custo de produção bem menor.

Entretanto, ao utilizar o soro de leite como fonte de carbono para produção de uma protease alcalina de um novo isolado de *Bacillus* sp. L21, os autores constataram que este resíduo proporcionou menor atividade específica da enzima (Tari *et al.* 2006)

Lee *et al.* (2003) visando a redução dos custos de produção do ácido succínico por *Mannheimia succiniciproducens* utilizaram soro de leite e água de maceração de milho no meio de cultura, obtendo resultados bastante satisfatórios.

4.1.4. Efeito da concentração da água de maceração de milho

A água de maceração de milho (AMM) é também considerada uma fonte de nutriente relativamente barata e satisfatória para a produção de vários compostos, incluindo as enzimas (Rivas *et al.*, 2004). Além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, este resíduo fornece vários micro-nutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (Kumar e Takagi, 1999). Para definir sua melhor concentração para a secreção da protease pelo *Bacillus* sp. SMIA-2, quantidades diferentes da mesma foram adicionadas ao meio de cultura.

A concentração da água de maceração de 0,2% foi àquela que promoveu a máxima atividade da protease com níveis de 58,4 U/mgPTN, como mostrada na Figura 7. O aumento na concentração da AMM para 0,3% não contribuiu efetivamente para o aumento na produção da protease e concentrações maiores causaram uma repressão na produção. Além disso, não foram observadas grandes alterações em relação ao crescimento do microrganismo e dos valores do pH do meio, com a variação das concentrações da AMM.

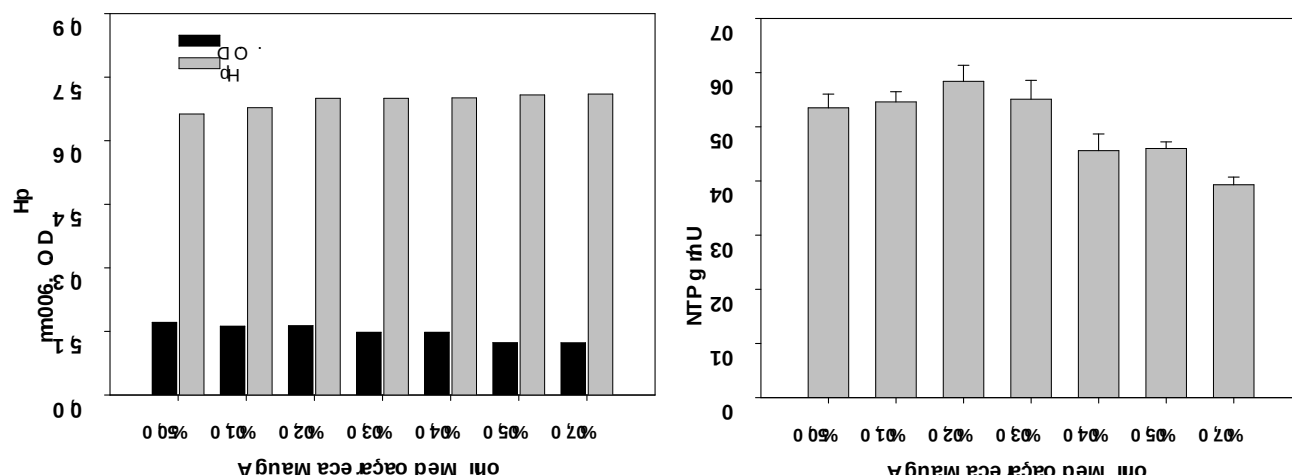


Figura 7 – Efeito da concentração da água de maceração de milho no crescimento e na produção da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50 °C e pH inicial 7,5.

Em estudo realizado na obtenção da enzima transferase de *Aspergillus foetidus* a água de maceração de milho foi das fontes de nitrogênio testadas, aquela que proporcionou a melhor atividade para essa enzima (Wang e Rakshit, 1999).

Resultados muito semelhantes são reportados por Tari *et al.* (2006) onde a água de maceração de milho proporcionou um aumento bastante significativo na atividade da protease do *Bacillus* sp. L21, tornando-se o foco de atenção devido ser uma fonte de nitrogênio de menor custo. Porém Mabrouk *et al.* (1999) verificaram um drástico decréscimo na atividade da protease do *Bacillus licheniformis* ATCC 21415 quando utilizaram como fonte de nitrogênio uréia, farelo de trigo e a água de maceração de milho.

4.2 Caracterização parcial da protease

4.2.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A atividade da protease foi intensificada nos valores de pH acima de 7,0; alcançando seu máximo no valor de pH 8,5. Nos valores acima de 8,5 foi observada uma redução na atividade, caracterizando a desnaturação da enzima. No pH 10 a atividade da enzima foi reduzida a 17,2% da sua atividade máxima (Figura 8).

Os resultados observados para a estabilidade ao pH da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 também são mostrados na Figura 8. Verificou-se que a estabilidade da protease aumentou à medida que os valores de pH também foram aumentados. Porém no pH ótimo (8,5) a protease manteve 84,5% da sua atividade após 2 horas de incubação a temperatura ambiente. Em valores de pH acima de 8,5 a estabilidade da protease foi reduzida.

Como pode ser visto essa enzima é muito similar a outras proteases alcalinas onde a atividade ótima ocorre na faixa de pH 8-12. De acordo com Beg e Gupta (2003) devido a essa faixa de pH, as proteases são de grande interesse para a utilização em formulações de detergentes, pois estes produtos possuem um pH nessa mesma faixa.

Resultados semelhantes são reportados por Phadatore *et al.* (1993) na avaliação de uma protease alcalina de *Conidiobolus coronatus*, onde esta enzima mostrou alta estabilidade em pH acima de 8,5.

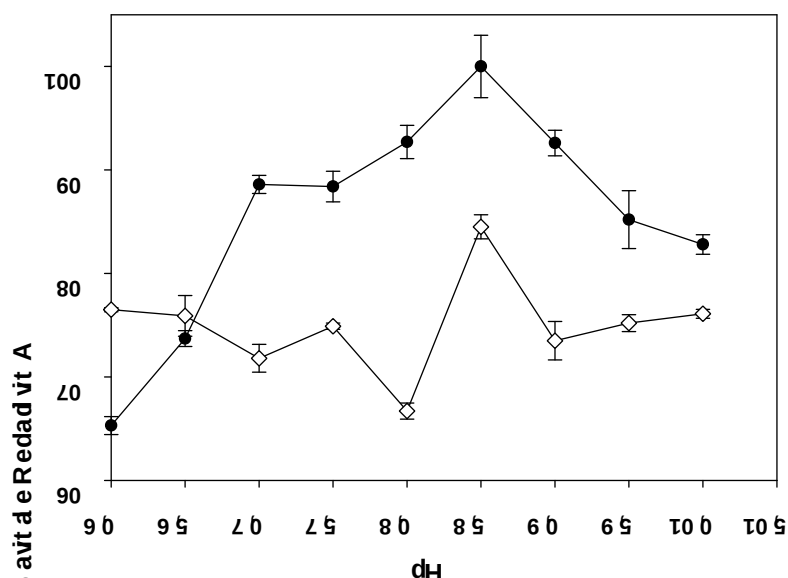


Figura 8 – pH ótimo (•) e estabilidade (◊) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 14h de incubação a 50 °C. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada após 2h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH. (100% atividade enzimática = 35,8 U/mgPTN).

Kobayashi *et al.* (1996) no estudo de purificação de proteases de um *Bacillus* sp. KSM-K16 halcalofílico citam que a máxima atividade utilizando caseína como substrato foi observada no pH 11 a uma temperatura de 60 °C. Resultados semelhantes também são encontrados no estudo com *Bacillus brevis* onde sua protease alcalina mostrou baixa atividade em pH 6,5 com apenas 22% da sua atividade e em pH 7,5 sua atividade foi de 77% alcançando sua máxima atividade em pH 10,5 (Banerjee *et al.*, 1999).

Essa elevada faixa de pH encontrada para a protease do *Bacillus* SMIA-2 está em concordância com várias citações onde mostram um pH ótimo de 8-12 para as proteases de *Bacillus* sp., *Thermus aquaticus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Vibrio metschnikovii* dentro outros (Debette, 1991).

4.2.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease

Com o aumento gradual da temperatura na faixa de 40 °C a 70 °C observou-se também um aumento bastante significativo na atividade da protease. Sendo a temperatura de 70 °C a temperatura ótima da enzima; porém 60 °C proporcionou uma atividade próxima da ótima. Em temperaturas mais elevadas a enzima teve sua atividade reduzida drasticamente, perdendo em torno de 61,33% e 81,6% de sua atividade nas temperaturas de 90 °C e 100 °C, respectivamente (Figura 9).

Os resultados observados para a estabilidade térmica também são mostrados na Figura 9. O aumento da temperatura proporcionou uma redução na atividade da enzima. Sendo que a 40°C e a 60 °C a enzima manteve 95,5% e 79,3% da sua atividade, respectivamente. A 70 °C observou-se quase sua inativação, devido principalmente a exposição a elevadas temperaturas, mantendo somente 8,44% da sua atividade.

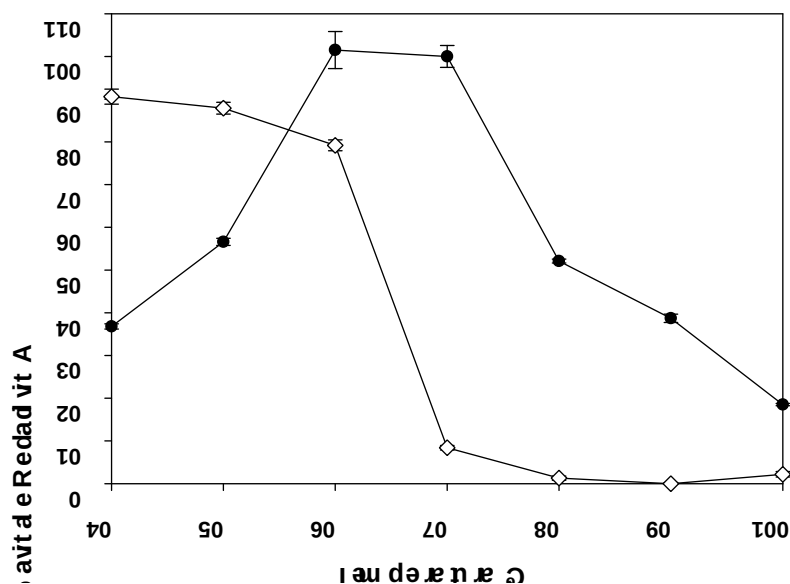


Figura 9 – Temperatura ótima (●) e estabilidade (◇) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 14h de incubação a 50 °C. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática em diferentes temperaturas. A estabilidade térmica foi determinada após 1h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de temperatura. (100% atividade enzimática = 42,64 U/mgPTN)

Tais características apresentadas pela protease do *Bacillus* sp. SMIA-2, são citadas como importantes para o uso dessas proteases alcalinas na formulação de detergentes (Banerjee *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002b), uma vez que as lavagens são efetuadas quase sempre em temperaturas mais elevadas.

Duas importantes proteases alcalinas utilizadas na indústria de detergentes a subtilisina Calberg, produzida por *Bacillus licheniformis* e subtilisina Novo ou “Bacterial Protease Nagase” (BPN) produzido por *Bacillus amyloliquefaciens*, também possuem temperaturas ótimas a 60 °C (Horikoshi, 1990).

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 no pH 9 (pH ótimo). A enzima manteve 60% da sua atividade após 30 minutos de aquecimento a 70 °C.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, representando cerca de 60% do total de enzimas comercializadas. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases esteja relacionada ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo. Portanto sua otimização é de grande importância para a redução dos gastos envolvidos com sua produção. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo otimizar um meio de cultura contendo soro de leite e água de maceração de milho para a secreção de proteases.

A adição da maltose (0,5%) e da lactose (0,5%) individualmente as culturas líquidas contendo soro de leite, água de maceração de milho e sais minerais aumentou a secreção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2. Com a adição da maltose ao meio foram obtidos níveis de atividade da protease de 16,23 U/mgPTN, o que correspondeu a um aumento superior a dez vezes na atividade da enzima. A melhor concentração da maltose para a secreção da protease foi definida como sendo de 1%.

Um estudo do perfil da síntese da protease com o tempo de fermentação revelou que a enzima foi secretada seis horas após a inoculação do

microrganismo no meio de cultura, alcançando a atividade máxima após doze horas de crescimento com níveis de 53 U/mgPTN. Após este período, a atividade da enzima, decresceu sugerindo que a produção da protease é concomitante ao crescimento do microrganismo. Quando este diminui ou cessa a sua atividade metabólica, a produção da protease também diminui.

O *Bacillus* sp. SMIA-2 foi capaz de utilizar outras fontes de carbono além da maltose e lactose e secretar a protease no meio de cultura. Entretanto, o amido e a maltose foram as fontes que proporcionaram maiores atividades da protease, com níveis de 38,42 U/mgPTN e 35,83 U/mgPTN, respectivamente. A peptona (0,1%) foi a fonte de nitrogênio que ofereceu a máxima atividade específica da protease com níveis de 42,62 U/mgPTN. As demais fontes orgânicas e inorgânicas testadas causaram uma redução na atividade da protease.

A concentração do soro de leite que proporcionou melhor atividade da protease foi 0,1%. Concentrações maiores que 0,15% causaram uma repressão na síntese da enzima. Em relação à concentração da água de maceração de milho no meio de cultura foi encontrado que 0,2% foi a que promoveu a melhor atividade da protease. Concentrações acima de 0,3% não influenciaram a atividade da protease e concentrações maiores que esta, causaram uma inibição da sua síntese.

A atividade da protease foi intensificada nos valores de pH acima de 7,0; alcançando seu máximo no valor de pH 8,5. Nos valores acima de 8,5 foi observada uma redução na atividade, caracterizando a desnaturação da enzima. No pH 10 a atividade da enzima foi reduzida a 17,2% da sua atividade máxima. A estabilidade da protease aumentou à medida que os valores de pH também foram aumentados. Porém no pH ótimo (8,5) a protease manteve 84,5% da sua atividade após 2 horas de incubação a temperatura ambiente. Em valores de pH acima de 8,5 a estabilidade da protease foi reduzida.

Com o aumento gradual da temperatura na faixa de 40 °C a 70 °C observou-se também um aumento bastante significativo na atividade da protease, sendo a temperatura de 70 °C a temperatura ótima da enzima. As temperaturas de 90 °C e 100 °C a enzima teve sua atividade reduzida drasticamente, perdendo em torno de 61,33% e 81,6% de sua atividade, respectivamente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, M.W.W. E Kelly, R.M. (1998). Finding and using hyperthermophilic enzymes. *Trends Biotechnology*, 16:329-332.
- Aiyappa, P.S. E Harris, J.O. (1976). The extracellular metalloprotease of *Serratia marcescens*: I. Purification and characterization. *Mol Cell Biochem.* 13:95-100.
- Andersen, L.P. (1998). Method for dehairing of hides or skins by means of enzymes. *US Patent*. 5,834,299.
- Atalo, K. E Gashe, B.A. (1993). Protease production by a thermophilic *Bacillus* species (P-001A) which degrades various kinds of fibrous proteins. *Biotechnology Letters*. 11(15):1151-1156.
- 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.

- Barret, A.J. (1994). Proteolytic Enzyme: aspartic and metallopeptidases. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:294-304.
- Beg, Q.K.; Saxena, R.K.; Gupta, R. (2002). De-repression and subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed-bach operations. *Process Biochem*. 37:1103-1109.
- Bolton, J.D.; Kelly, C.K.; Fogarty, W.M. (1997). Purification and characterization of the α -amilase of *Bacillus flavothermus*. *Enzyme and Microbial Technology*. 20:340-343.
- Brock, T.D. (1985). Life at High Temperatures. *Science*. 230:132-138.
- Chauhan, B. E Gupta, R. (2004). Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus sp.* RGR-14. *Process Biochemistry*. 39:2115-2122.
- Debette, J. (1991). Isolation and characterization of an extracellular protease produced by a soil of *Xantomonas maltophilia*. *Curr Microbial*. 22:85-90.
- Demirijan, D.; Moris-Varas, F.; Cassidy, C. (2001). Enzymes from extremophiles. *Curr. Opin. Chem. Boil*. 5:144-151.
- De Rosa, M.; Morana, A.; Riccio, A. Gambacorta, A.; Trincone, A.; Incani, O. (1994). Lipids of the archaea: a new tool for bioelectronics. *Biosens. Bioelectr*. 9:669-675.
- Doolittle, W.F. E Logsdon, J.M. (1998). Archaea genomics: do archaea have a mixed heritage? *Curr. Biol*. 8:R209-R211.
- Everly, C. e Alberto, J. (2000). Stressors, stress and survival: overview. *Front. Biosci*. 5:780-786.

- 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. of Industrial Microb. & Biotechn.* 23:86-90.
- Friedrich, J.; Gradisar, H.; Mandin, D.; Chaumont, J.P. (1999). Screening fungi for synthesis of keratinolytic enzymes. *Lett Appl Microbiol.* 28:127-130.
- Gessesse, A.; Hatti-Kaul, R.; Gashe, B.A.; Mattiasson, B. (2003). Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology.* 32:519-524.
- Gessesse, A. e Gashe B.A. (1997). Production of alkaline protease by an alkaliphilic bacteria isolated from an alkaline soda lake. *Biotechnology Letter.* 19(5):479-481.
- Gey, M. E Unger, K. (1995). Calculation of the molecular masses of two newly synthesized thermostable enzymes isolated from thermophilic microorganisms. *J Chromatogr.* 64:3533-3535.
- Ghordel, B.; Sellami-Kamoun, A.; Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology.* 32:513-518.
- Godfrey, T.A. E Reichelt, J. (1985). Industrial Enzymology: The Application of Enzymes in Industry. London: *The Nature Press*.
- Grogan, D.W. (2000). The question of DNA repair in hyperthermophilic archaea. *Trends in Microbiology.* 8(4):180-185.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. (2002a). An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases. *Appl. Microbial Biotechnol.* 60:381-395.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Lorenz, P. (2002b). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 59:15-32.

- Haki, G.D. E Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-37.
- Hameed, A.; Keshavarz, T.; Evans, C.S. (1999). Effect of dissolved oxygen tension and pH on the production of extracellular protease from a new isolate of *Bacillus subtilis* K2, for use in leather processing. *J Chem Technol Biotechnol*. 74:5-8.
- Han, X.Q. E Damodaran, S. (1997). Isolation, identification and fermentation of a *Bacillus* species producing a detergent-stable endopeptidase. *Journal Agric. Food Chem*. 45 (11):4191-4195.
- Hayano, K.; Takeuchi, M.; Ichishima, E. (1987). Characterization of a metalloproteinase component extracted from soil. *Biol. Fertil Soils*. 4:179-183.
- Horikoshi, K. (1990). Enzymes of alkalophiles. In: *Microbial Enzyme and Biotechnology*, 2nd. 275-294.
- Hough, D.W. E Danson, M.J. (1999). Extremozymes. *Curr. Opinion. Chem. Biol*. 3: 39-46.
- Jacobs, I.; Eliasson, M.; Uhlen, M.; Flock J.I. (1985). Cloning, sequencing and expression of subtilisin Carlsberg from *Bacillus licheniformis*. *Nucleic Acids Res*. 13:8913-8926.
- Jaenicke, R. E Böhm, G. (1998). The stability of proteins in extreme environments. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 8:738-748.
- Johnvesly, B. E 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.
- Kalisz, H.M. (1988). Microbial proteinases. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 36:1-65.

- Kobayashi, T.; Hakamada, Y.; Hitomi, J.; Koike, K.; Ito, S. (1996). Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl Microbiol Biotechnol.* 45:63-71.
- Konsoula, Z. e Liakopoulou-Kyriakides, M. (2005). Co-production of α -amilase e β -galactosidase by *Bacillus sbtilis*. *Bioresource Technology.* xxx:xxx-xxx.
- Kosikowski, F.V. (1979). Whey utilization and whey products. *J. Diary Sci.* 62:1149-1160.
- Kumar, C.G. (2002). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from alkalophilic *Bacillus pumilus*. *Lett Appl. Microbiol.* 34:13-17.
- Kumar, C.G. E Takagi, H. (1999). Research review paper Microbial alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17:561-594.
- Lee, J.K.; Kim, H.K.; Park, S.Y.; Oh, T.K. (1996). Purification and characterization of a thermostable alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. E79 and the DNA sequence of the encoding gene. *Biosci Biotechnol Biochem.* 60:840-846.
- 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.
- Leuschner, C. E Antranikian, G. (1995). Heat-stable enzymes from extremely thermophilic and hyperthermophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology. & Biotechnology.* 11:95-114.
- Mabrouk, S.S; Hashem, A.M.; El-Shayeb, N.M.A.; Ismail, A.-M.S.; Abdel-Fattah, A.F. (1999). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresourse Technology.* 69:155-159.

- Manachini, P.L. e 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.
- Markland, F.S. E Smith, E.L. (1971). Subtilisin: primary structure, chemical and physical properties. In: Boyer PD, editor. The enzymes, 3rd. New York: Academic Press. 561-608.
- Marwaha, S.S. E Kennedy, J.F. (1988). Review: Whey-pollution problem and potential utilization. *Int J Food Sci Technol*. 23:323-336.
- Masse, F.W.J.L. E Tilburg, R.V. (1983). The benefit of detergent enzymes under changing washing conditions. *Journal Am. Oil Chem. Soc.* 60:1672-1675.
- Maurer, K. (2004). Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnol.* 15:300-334.
- Mehrotra, S.; Pandey, P.K.; Gaur, R.; Darmwal, N.S. (1999). The production of alkaline protease by a *Bacillus* species isolate. *Bioresource Technology*. 64:201-203.
- Ming Chu, I.; Lee, C.; Li, T.S. (1992). Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 144716. *Enzyme Microb. Technol.* 14:755-761.
- Miyazaki, H.; Yamagida, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T. (1990). Specific excretion into the medium of a serine protease from *Serratia marcescens*. *Agric Biol Chem*. 54:2763-5.
- Moriyama, K.O. (1992). In Microbial Degradation of Natural Products, ed Winkelmann, G. pp.293-364. Weinheim: VCH.

Nascimento, W.C.A. E Martins, M.L.L. (2004). Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian J of Microbiol.* 35:91-96.

Nascimento, Wellington Cristina Almeida. Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais. p.79. Tese - Doutorado Produção Vegetal - Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2005.

Neklyidov, A.D.; Ivankin, A.N.; Berdutina, A.V. (2000). Properties and uses of protein hydrolysates (review). *Appl Biochem Microbiol.* 36:452-459.

Outtrup, H.; Dambmann, C.; Christiansen, M.; Aaslyng, D.A. (1995). *Bacillus* sp. JP 395, method of making and detergent composition. US Patent Number, 5466594.

Patel, R.; Dodia, M.; Singh, S.P. (2005). Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: Production and optimization. *Process Biochemistry.* 40:3569-3575.

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.

Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.* 41:711-753.

Puente, X.S.; Sanchez, L.M.; Overall, C.M.; Lopez-Otin, C. (2003). Human and mouse protease: a comparative genomic approach. *Nat. Rev. Genet.* 4:544-548.

- Rahman, R.N.Z.A.; Razak, C.N.; Ampon, K.; Basri, M.; Yunus, W.M.Z.W.; Salleh, A.B. (1994) Purification and characterization of a heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *App. Microbiol. and Biotech.* 40:822-827.
- Rahman, R.N.Z.R.A.; Geok, L.P.; Basri, M.; Salleh, A.B. (2005). An organic solvent-tolerant protease from *Pseudomonas aeruginosa* strain K: Nutritional factors affecting protease production. *Enzyme and Microbial Technology.* 36:749-757.
- Rao, M.B.; Tanksale, A.M.; Ghatge, M.S.; Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:597-635.
- Rattray, F.P.; Bockelmann, W.; Fox, P.F. (1995). Purification and characterization of and extracellular proteinase from *Brevibacterium linens* ATCC 9174. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3454-3456.
- Razak, C.; Tang, S.; Basri, M.; Salleh, A. (1997). Preliminary study on the production of extracellular protease from a newly isolated *Bacillus* sp. (no.1) and the physical factors affecting its production, *Pertanika. J. Sci. Technol.* 5:94-100.
- Rivas, B.; Moldes, A.B.; Domínguez, J.M.; Parajó, J.C. (2004). Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *Inter J of Food Microbiol.* 97:93-98.
- Romero, F.J.; Garcia, L.A.; Salas, J.A.; Diaz, 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.
- Schmitz, G.V. E Braum, V. (1985). Cell-bound and secreted proteases of *Serratia marcescens*. *Journal Bacteriology.* 161:1002-9.

- Singh, J.; Vohra, R.M.; Sahoo, D.K. (2003). Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochem.* 39:1093-1101.
- Siso, M.I.G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology.* 57:1-11.
- 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 citricum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. *Química Nova.* 21:722-725.
- Varela, H.; Ferrari, M.D.; Velobradjic, L.; Weyrauch, R.; Loperena, M.L. (1996). Effect of medium composition on the production by a new *Bacillus subtilis* isolate of protease with promising unhairing activity. *World J. Microbiol Biotechnol.* 12:643-645.
- Vermelho, A.B. & Branquinha, M.H. (2005). Proteases de microrganismos. Disponível em <http://acd.ufrj.br/proteases/ProteaseApres.htm>, acessado em 19/08/2005.
- Vieille, C.; Burdette, D.L.; Zeikus, J.G. (1996). Thermozyms. *Biotech. Ann. Rev.* 2:1-83.
- Wandersman, C. (1989). Secretion, processing and activation of bacterial extracellular proteases. *Mol Microbiol.* 3:1825-31.

- Wang, X.-D. e Rakshit, S.K. (1999). Improved extracellular transferase enzyme production by *Aspergillus foetidus* for synthesis of isooligosaccharides. *Bioprocess Engineering*. 20:429-434.
- Ward, O.P. (1985). Proteolytic enzymes. In: Moo-Yung, M. (Ed), *Comprehensive Biotechnology*, Vol III. *Academic Press, New York*. pp. 789-815.
- Wiseman, A. (1985). *Manual de Biotecnologia de los enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Wolff, A.M.; Showell, M.S.; Venegas M.G., Barnett, B.L. Wertz, W.C. (1996). Laundry performance of subtilisin protease. In: Bolt R, Betzel C, editors. *Subtilisin enzymes: practical protein engineering*. *New York: Plenum Press*. 113-20.
- Yeoman, K.H. E Edwards, C. (1994). Protease production by *Streptomyces thermovlugaris* grown on rapemeal-derived media. *J Appl Bacteriol*. 77:264-70.
- Zhang, J. E Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 51:407-421.