

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A
PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp. SMIA-2.**

Andréia Boechat Delatorre

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO/2008

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A
PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2.**

Andréia Boechat Delatorre

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Química”.

Orientador: Prof. PhD. Meire Lelis Leal Martins

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO/2008

**UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A
PRODUÇÃO DE PROTEASES PELO MICRORGANISMO
TERMOFÍLICO *Bacillus* sp SMIA-2.**

Andréia Boechat Delatorre

“Monografia apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Licenciado em Química”.

Aprovada em 22 de Janeiro de 2008.

Comissão Examinadora:

Dr^a. Raquel Vieira de Carvalho
(D.Sc, Produção Vegetal)

Dr^a.Silvia Menezes de Faria Pereira
(D.Sc, Engenharia de Ciências dos Materiais)

Prof^a. PhD. Meire Lelis Leal Martins
(PhD, Microbiologia)

“Deus nos dá os anjos, para nos ensinar, cuidar e amar. E quando menos esperamos eles vão embora, isso é sinal de que já fomos ensinados, cuidados e amados”.

(Autor desconhecido)

A minha querida e inesquecível Vovó Georgina,
pelo amor, por to carinho, e pelo exemplo de
pessoa e de mãe. Meu eterno amor a você.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a DEUS, por tudo que tenho e sou pela proteção e por esta sempre ao meu lado me guiando. Sem ele eu nada seria.

A minha Orientadora, Meire, por ter aceitado me orientar, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação, e, sobretudo por acreditar que eu era capaz de seguir este trabalho sozinha.

A Raquel, por aceitar fazer parte dessa banca de monografia, pela paciência e atenção, pelo carinho e principalmente pelo companheirismo no período mais difícil. Não tenho nem palavras para agradecê-la. Você é 10.

A Silvia, por fazer parte dessa banca de monografia, pelos momentos de descontração, por ser sempre prestativa e atenciosa. Obrigada!!!!

A minha inesquecível “chefinha”, Camila, pelos ótimos momentos que passamos e por tudo que fez por mim desde o início do meu trabalho, por nunca ter medido esforços para me ajudar. Sou muito grata a você. Te adoro!!!!

Aos meus amigos de bancada, Luciana Konda, Luciana Coutinho, Thamy, obrigada pela amizade e pelo convívio ao longo desses anos. Adorei conhecê-las.

Agradeço de forma especial a Marcela e a Silvania, pelas ajuda, pelo abrigo, pelo carinho e preocupação que teve comigo. Obrigada pela amizade

A técnica do laboratório Aninha, pela colaboração e paciência.

Aos demais amigos do LTA, Vanessa, Luciana, Natalia, Juliana, Shailine, Naiara e Cristiano, pelos bons momentos que passamos juntos principalmente na hora do “cafezinho”. Foi ótimo conhecê-los

Aos Professores do CCT, obrigado pelos ensinamentos.

Aos amigos de Turma Fernanda, Leisiane, Carlinhos, Luis Carlos, Alinne, Vivian, pelo companheirismo e por passarem comigo os piores e melhores momentos da minha graduação. Vocês são parte de minha vida.

Agradeço as meninas do “AP”, Thais, Renata, Jéssica, Natalia e Priscilla, por suportarem todas as noites de estudo, pelo carinho e amizade.

Em especial agradeço as irmãs que adquiri nesta jornada, Rogéria, Alice, Erica e Aline, pela amizade e cumplicidade, pelo carinho e atenção, por estarem comigo em tudo para o que desse e viesse. Adoro vocês.

Agradeço a uma pessoa muito especial, que ao longo desse tempo se tornou minha segunda mãe, Kátia, obrigada por me ouvir, por me acalmar, e por ser sempre prestativa. Adoro Você.

Agradeço a minha irmã, Edilaine, por esta sempre disposta a me ajudar e aos meus sobrinhos, João Victor e Marcio Jr, a titia ama vocês.

Agradeço em especial a uma pessoa que DEUS colocou em minha vida, meu grande amor Marcio D'êça que não mediu esforços para que este trabalho fosse realizado, que enfrentou comigo dias de chuva e sol, madrugadas e fins de semana, que me consolou quando muita vezes chorei, que me levantou em todas as quedas e que me compreendeu durante todo essa caminhada é por isso e por muito mais que eu TE AMO.Você é muito especial.

Aos meus pais, Sebastião e Angela que são minha fortaleza, meu orgulho, minha paixão. Agradeço por terem me apoiado em todos os momentos, me incentivando e me encorajando nas dificuldades. Vocês são tudo na minha vida, obrigado pelo alicerce familiar que me deram, isso foi fundamental. Amo muito vocês.

E por fim, agradeço a uma pessoa única que passou em minha vida e de quem tenho muitas saudades, minha grande avó, Georgina, que rezou muito para que eu chegasse até o fim desta jornada desafiadora, mais que hoje infelizmente não pôde estar aqui, mais tenho certeza que de onde estiver estará recebendo o muito obrigado, pela pessoa que me ensinou a ser, pelo carinho e dedicação e principalmente pelo exemplo de ser humano que foi A você o meu ETERNO AMOR.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	1
1.0. INTRODUÇÃO	2
2.0. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Microrganismos termofílicos e suas enzimas.....	4
2.2. Fontes de proteases.....	5
2.3. Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas.....	6
3.0. MATERIAI E MÉTODOS	9
3.1. Microrganismo e condições de crescimento.....	9
3.2. Manutenção do microrganismo.....	9
3.3. Meio de crescimento.....	9
3.4. Pré inoculo.....	10
3.5. Preparo do inoculo.....	10
3.6. Crescimento do microrganismo.....	10
3.7. Atividade da enzimática.....	11
3.8. Determinação da proteína.....	11
3.9. Utilização dos resíduos, proteína do soro de leite, água de maceração de milho e melaço de cana para a produção de proteases por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2.....	12
3.9.1. Influência da concentração da proteína do soro de leite sobre o crescimento e atividade da enzima.....	12

3.9.2. Influência da concentração da água de maceração de milho sobre o crescimento e atividade da enzima.....	12
3.9.3. Influência da concentração do melaço de cana sobre o crescimento e atividade da enzima.....	12
3.10. Caracterização da enzima bruta.....	13
3.10.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	13
3.10.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease.....	13
3.10.3. Efeito da concentração do NaCl na atividade.....	14
4.0.RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	15
4.1. Crescimento e atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado em meio contendo proteínas do soro de leite e água de maceração de milho.....	15
4.1.1. Efeito da concentração da proteína do soro de leite.....	15
4.1.2. Efeito da concentração da água de maceração de milho.....	17
4.1.3 Caracterização da enzima bruta em meio de cultivo contendo proteínas do soro de leite, água de maceração de milho e maltose	18
4.1.3.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	18
4.1.3.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease.....	19
4.1.3.3. Efeito da concentração do NaCl na atividade da protease.....	20
4.2. Crescimento e atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado em meio contendo proteínas do soro de leite, água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar.....	21
4.2.1. Influência da concentração do melaço de cana na atividade da protease.....	22
4.3. Crescimento e atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 cultivado no meio contendo proteína do soro de leite e caldo de cana de açúcar.....	23

4.3.1. Influência da concentração do caldo de cana de açúcar na atividade enzimática.....	24
4.4. Caracterização da protease secretada por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 no meio de cultura contendo proteínas do soro e caldo de cana.....	25
4.4.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	25
4.4.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease.....	27
5.0. CONCLUSÕES FINAIS.....	28
6.0.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

1. Crescimento (○), pH (●) e atividade da protease (Δ) por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescendo a 50°C em meio contendo 0,1% proteínas do soro de leite, 0,2% de água de maceração de milho e 1% de maltose..... 15
2. Efeito da concentração do soro de leite no crescimento (a) e na atividade (b) da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50 °C/180rpm e pH inicial 7,5..... 16
3. Efeito da concentração da água de maceração de milho no crescimento (a) e na atividade(b) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de cultivo a 50 °C/180rpm e pH inicial 7,5..... 17
4. O 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)..... 18
5. Efeito da temperatura na atividade (◆) e estabilidade (■) da protease, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. A estabilidade térmica foi determinada após a incubação da protease por 1h nas diferentes temperaturas (100% atividade enzimática = 42,64 U/mg de proteína)..... 19
6. Efeito da concentração de NaCl na atividade da α-amilase liofilizada, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 durante 1hora (◆) 2 horas (■) de incubação a 45°C. Atividade relativa foi expressa como percentual da atividade máxima (100% da Atividade Enzimática = 41 U/mg de proteína)..... 20
7. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em 0,5% de melaço de cana e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite e 0,2% de água de maceração de milho a 50°C..... 22
8. Influência da concentração do melaço de cana no crescimento (a) e na atividade (b) da protease..... 22
9. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em 0,2% de caldo de cana e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite a 50°C..... 24
10. Crescimento (a) e atividade da protease (b) de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em nas concentrações de caldo de cana de 0,05% e 0,2% e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite a 50° C..... 25

- 11.** O pH ótimo (♦) e estabilidade (■) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 24h 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 = 25 U/mg de proteína).....26
- 12.** Temperatura ótima (♦) e estabilidade (■) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 24h de incubação a 50°C. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. A estabilidade térmica foi determinada após a incubação da protease por 1h nas diferentes temperaturas (100% de atividade = 26 U/mgProteína).....27

RESUMO

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. O soro de leite, água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar, são exemplos destes resíduos, que podem ser aproveitados como substratos biotecnológicos, para a produção de vários compostos importantes para a indústria, incluindo as enzimas. As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo. O uso de substratos de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, pode ser uma alternativa para reduzir os custos de sua produção. Neste contexto, esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de otimizar a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2, a partir de um meio de cultura de baixo custo. Para tal o crescimento e a atividade de protease foi avaliada através do cultivo microrganismo em um meio contendo proteína do soro de leite, água de maceração de milho, melaço e caldo de cana.

O *Bacillus* sp SMIA-2 cresceu e secretou proteases quando cultivado num meio contendo água de maceração de milho e proteínas do soro de leite. As melhores concentrações da água de maceração de milho e da proteína do soro foram 0,2% e 0,1% respectivamente. A produção máxima da protease foi observada com 24 horas de crescimento com níveis de 57 U/mgPTN. 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 58% e 77% de sua atividade, respectivamente. Quanto à estabilidade térmica da protease foi observado que esta enzima reduziu sua estabilidade em temperaturas maiores que 60 °C. O pH ótimo da enzima foi 8,0. Acima deste valor, foi observada uma redução na atividade da enzima.

1.0. INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos muito conhecidos. Por executarem uma série de reações químicas são extensivamente explorados pela indústria de base biotecnológica.

A substituição de agentes químicos perigosos por enzimas, tem despertado um grande interesse das indústrias, uma vez que não causam agressão ao meio ambiente. Além de minimizarem os problemas ambientais, trabalham em condições amenas, podem ser utilizadas no tratamento de resíduos biológicos e são biodegradáveis (Nascimento, 2003).

As proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais, representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo (Rao *et al.*, 1998). Estão entre o grupo mais importante sob o ponto de vista biotecnológico com participação importante e indispensável em muitos processos industriais tais como na indústria farmacêutica, de alimentos e de detergentes.

Uma protease produzida por *Bacillus cereus* apresentou excelente estabilidade em detergentes, mantendo cerca de 80% de estabilidade após 1 hora de incubação a 40 e 50°C (Banik e Prakash, 2004), enquanto que uma protease produzida por *Bacillus sp.*, manteve mais de 80% e 65% de atividade após 30 minutos de incubação em presença de alguns detergentes (Nascimento e Martins, 2006). Resultado semelhante foi encontrado por Carvalho *et al.*, (2006) quando estudou o efeito dos detergentes na atividade da α -amilase de *Bacillus sp.*. Os resultados mostraram que a atividade da enzima aumentou quando foi incubada na presença de diferentes marcas de detergentes.

Enzimas de microrganismo termofílicos têm recebido considerável atenção da indústria por causa de suas características especiais, como estabilidade térmica e alta estabilidade às mudanças de pH. Por isso, podem ser usadas em diversos processos industriais, nos quais, substituem as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos ou produtos químicos. As principais vantagens do uso dessas enzimas em processos conduzidos a altas temperaturas são: redução do risco de contaminação microbiana, menor viscosidade – a maior parte dos reagentes torna-se mais solúvel, difundindo-se mais rapidamente e assim permitindo que

concentrações maiores desses compostos possam ser utilizadas; aumento da taxa de transferência de massa e da solubilidade dos substratos.

A resistência térmica é considerada um dos mais importantes critérios de aplicação industrial desta enzima, pois muitos dos processos em que a mesma é utilizada, requer o uso de elevadas temperaturas (kumar e Takagy, 1999).

Alguns microrganismos produzem uma quantidade limitada de enzimas dificultando sua aplicação industrial, porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de resíduos agroindustriais para o crescimento de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático.

Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de enzimas está selecionado ao meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo (Joo e Chang, 2005). Portanto sua otimização é de grande importância para a redução dos gastos com sua produção.

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. O soro de leite água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar são exemplos destes resíduos, que podem ser aproveitados como substratos utilizados para processos biotecnológicos, para a produção de vários compostos importantes para a indústria, incluindo as proteases. (Pandey et al., 2000)

O Brasil, atualmente, importa a maior parte das enzimas que utiliza, embora apresente um enorme potencial para produzi-las, por dois motivos em especial: abundância de matéria orgânica (resíduos agrícolas, como, palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana, etc.) que constitui substrato de baixo custo para fermentações e a enorme diversidade biológica, ainda pouco explorada, para a descoberta de novos organismos produtores de enzimas de interesse industrial (Hernandez et al., 2005).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de resíduos agroindustriais e caldo de cana como substrato para a produção de proteases pelo microrganismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2.

2.0. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Microrganismos termofílicos e suas enzimas

Os microrganismos termofílicos podem ser classificados como bactérias ou archaea e são capazes de crescer em altas temperaturas. Segundo análises genéticas, os organismos são divididos em três domínios distintos: Eukarya (eucariotos), Bacteria e Archaea (procariotos) (Tehei e Zaccai, 2005). Exemplos de extremófilos ocorrem em ambos os domínios procariotas, mas os dados disponíveis permitem concluir que estes organismos tendem a pertencer ao domínio Archaea (Santos *et al.*, 2001 e Hough e Danson, 1999).

A temperatura é um dos fatores ambientais que mais influencia o crescimento e a sobrevivência dos organismos (Fomenkova *et al.*, 1998 e Madigan *et al.*, 1996). Bacteria e Archaea são classificados em psicrófilos, mesófilos e termófilos com temperaturas ótimas de crescimento variando de 0-20, 10-50 e 40-110°C, respectivamente (Tolner *et al.*, 1997). O último grupo pode ser subdividido em termófilos moderados, termófilos e hipertermófilos (Demirjian *et al.*, 2001).

Esses microrganismos termofílicos produzem enzimas que são conhecidas como enzimas termoestáveis (Tolner *et al.*, 1997). Esses microrganismos abriram novas oportunidades para descoberta de enzimas que apresentam atividade em condições extremas de temperatura, possibilitando assim a sua utilização em processos industriais, onde esta condição é necessária (Hough e Danson, 1999; Banerjee *et al.*, 1999).

O crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por termofílicos está relacionado com sua capacidade de trabalhar em condições de elevadas temperaturas. Nestas condições, as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas (Hough e Danson, 1999). Segundo Rosa *et al.* (1994) os microrganismos termofílicos suportam condições de crescimento a altas temperaturas devido a sua membrana celular ser composta de ácidos graxos saturados que promovem um meio hidrofóbico para a célula, mantendo-a mais rígida e suportando assim temperaturas elevadas.

A busca por enzimas termoestáveis baseia-se no fato de que a utilização de temperaturas mais elevadas em um processo industrial, faz com que a velocidade

da reação aumente, necessitando da utilização de uma menor quantidade de enzimas, já que cada aumento de 10°C na temperatura, promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação. Além disso, a utilização de temperaturas maiores que 60°C inibe o crescimento de microrganismos contaminantes, reduzindo a possibilidade de contaminação microbiana, o que favorece sua utilização em indústrias de alimentos (Zamost *et al.*, 1991 e Wiseman, 1985).

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

2.2. Fontes de Proteases

A natureza por ser abundante em microrganismos é o primeiro alvo na busca por novas enzimas. A terra e a água são as principais fontes de microrganismos. Em uma pequena quantidade de terra podemos encontrar milhões de organismos como bactérias e fungos (Novozyme, 2002).

Uma excelente fonte para obtenção de enzimas são os microrganismos, pois estes apresentam uma ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade de manipulação genética. Com isso as proteases microbianas representam hoje aproximadamente 40% do custo mundial de enzimas, sendo preferidas que as de animais ou de plantas, por apresentarem quase todas as características desejáveis para sua aplicação biotecnológica (Kumar e Takagi, 1999 e Rao *et al.*, 1998).

As enzimas microbianas são mais utilizadas que as enzimas de plantas e animais devido à grande variedade catalítica, além de serem obtidas em elevadas quantidades, com preço relativamente reduzido, possuindo bastante homogeneidade e qualidade. Além disso, são mais estáveis que seus homólogos obtidos de plantas e animais e seu processo de produção é mais fácil e seguro (Wiseman, 1985). Os métodos de obtenção destas enzimas podem ser facilmente otimizados e as proteases microbianas podem ser mantidas sob armazenamento por um longo

período, não necessariamente em suas condições ótimas de atuação, sem perda significativa de sua atividade (Gupta *et al.*, 2002).

Com o crescimento da demanda por enzimas, houve uma limitação de materiais animais e vegetais levando a um aumento da utilização de enzimas microbianas, as quais começaram a ser utilizadas em larga escala.

As enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas por microrganismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas comercialmente e representam cerca de 20% do total de enzimas comercializadas no mundo, sendo sua aplicação predominante (35%) na indústria de detergentes (Beg *et al.*, 2002). Também são utilizadas no processamento de alimentos, indústria têxtil e farmacêutica e aplicações médicas. A ampla utilização destas enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalizadores (Phadatare, *et al.*, 1993, Mandigan *et al.*, 1996; Horikoshi, 1999; Kanekar, *et al.*, 2002).

O mercado de enzimas industriais é estimado em 2,3 bilhões de dólares (Mussato, *et al.*, 2007) e as enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% deste montante (Merheb *et al.*, 2006, Banerjee, *et al.* 1999). Deste valor, 40% são de fontes microbianas (Gupta *et al.*, 2002a) e cerca de 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes.

As proteases industriais são obtidas principalmente por fermentação submersa. O preço final desta enzima é determinado principalmente pelo meio de cultivo empregado na sua obtenção. No entanto, algumas alternativas como a adição de resíduos agroindustriais (Nascimento e Martins, 2006) e menores gastos com processos de recuperação do produto, podem ser adotadas a fim de baratear o processo (Prakasham, *et al.*, 2005; Arulmani *et al.*, 2007).

2.3. Utilização de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas

A crescente preocupação com o meio ambiente vem mobilizando vários segmentos do mercado. Inúmeros órgãos governamentais e indústrias estão se preparando para aplicar uma política ambiental que diminua os impactos negativos à natureza.

O resíduo industrial, depois de gerado, necessita de destino adequado, pois não pode ser acumulado indefinidamente no local em que foi produzido. A disposição dos resíduos no meio ambiente, por meio de emissões de matéria e de

energia lançados na atmosfera, nas águas ou no solo deve ocorrer após os resíduos sofrerem tratamento e serem enquadrados nos padrões estabelecidos na legislação ambiental para não causarem poluição (Aquarone, 1990).

A indústria de alimentos produz uma série de resíduos com alto valor de nova utilização. Inúmeros estudos utilizando resíduos da indústria de alimentos têm sido realizados com objetivo de aproveitamento destes como substrato biotecnológico para produção de enzimas. Com isso, minimiza-se o impacto ambiental destes tipos de indústrias na região onde estão situadas e ainda agrega-se valor aos produtos do mercado.

Bravo *et al.* (2000) pesquisaram a produção de poligalacturonase utilizando-se o caldo de cana (resíduos da indústria de sucro-alcóoleira). Neste sentido, Auria *et al.* (1993) utilizaram o bagaço de cana-de-açúcar como suporte para produção de protease pelo *A. niger*, utilizando um fermentador tipo coluna.

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de leite foi realizada por diversos pesquisadores (Nascimento *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2001; Feijoo *et al.*, 1999; Kosikowski, 1979) e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato. Portanto, devido a sua rica composição, o soro de leite é um substrato em potencial para a produção industrial de proteases microbianas.

O soro de leite é, dentre os subprodutos da indústria de laticínios, o constituinte de maior importância, tanto pelo volume gerado, como pela carga poluidora, que lançada em corpos receptores pode causar um grave problema ambiental. Aproximadamente 80% do volume do leite destinado à fabricação de queijos se transforma em soro. O soro de leite contém metade do extrato seco do leite, representado por lactose, proteínas solúveis e sais (Paolucci, 1991).

O processamento de grãos como o milho, para a produção de óleos e outros produtos, geram resíduos como a água de maceração de milho. Esse subproduto tem sido usado como uma fonte barata de nutrientes. Este resíduo constitui uma rica fonte em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fósforo (Rivas *et al.*, 2004).

A utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura, para o crescimento e para a produção de enzimas por microrganismos foi sugerida por autores como Burkert *et al.* (2004), Lee *et al.* (2003), Liu *et al.* (2002) e Kona *et al.* (2001).

Resíduos como a água de maceração de milho e as proteínas do soro de leite são riquíssimos em vitaminas, carboidratos e outros nutrientes. Contudo, são liberados no meio-ambiente causando danos ao mesmo.

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

3.0. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado neste estudo foi uma bactéria termofílica, *Bacillus* sp SMIA-2, isolada por Nunes e Martins (2001) a partir de amostras do solo do município de Campos dos Goytacazes, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do norte Fluminense (UENF). Segundo os mesmos autores, a comparação das seqüências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoolycticus* e *Bacillus* sp. AK1.

3.2. Manutenção do microrganismo

O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio TSY (Liao et al., 1986) (gL⁻¹): Triptona, 20; NaCl, 10; Extrato de levedura, 10; Ágar, 20, sob temperatura de refrigeração.

3.3. Meio de crescimento

Para a produção da protease foram utilizados os meios de cultura contendo os seguintes nutrientes (gL⁻¹):

MEIO 1 - Proteína do soro de leite 1,0; água de maceração de milho 2,0; maltose 10,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0; CaCl₂-2.2x10⁻³, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x 10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁵, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2.5x10⁻⁴, e H₃BO₃-3.0x10⁻⁴.

MEIO 2 - Proteína do soro de leite 1,0; melão de cana de açúcar 5,0; água de maceração de milho 2,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0; CaCl₂-2.2x10⁻³, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x 10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁵, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2.5x10⁻⁴, e H₃BO₃-3.0x10⁻⁴.

MEIO 3 - Proteína do soro leite 1,0; caldo de cana de açúcar 2,0; peptona 1,0; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0; CaCl₂-2.2x10⁻³, ZnO-2.03x10⁻³, FeCl₃.6H₂O-2.7x10⁻², MnCl₂.4H₂O-1.0x 10⁻², CuCl₂.2H₂O-8.5x10⁻⁵, CoCl₂.6H₂O-2.4x10⁻³, NiCl₃.6H₂O-2.5x10⁻⁴, e H₃BO₃-3.0x10⁻⁴.

O pH dos meios foi ajustado para 7,5 com solução de NaOH 1,0 M e esterilizados em autoclave à 121 0C por 15 minutos

3.2. Pré-inoculo

O microrganismo foi semeado em placas de Petri contendo meio TSY. As placas foram incubadas em estufa QUIMIS, modelo Q 315 D26, por 18 horas, a temperatura de 50°C. Após este período, 5mL do meio de crescimento descrito em 3.3 foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram, posteriormente, sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 25mL do respectivo meio de crescimento. Após isto, foram incubadas por mais 12 horas a 50°C em “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm.

3.3. Preparo do inoculo

O meio de crescimento foi inoculado com 1,0-1,5mL da cultura de véspera (pré-inóculo). Este volume é suficiente para que a absorbância inicial da cultura seja igual a 0,1. Então, foi novamente incubado em “shaker” a 150 rpm e 50 °C.

Em intervalos de tempo pré-determinados, foram retiradas alíquotas para a determinação da atividade da enzima.

3.4. Crescimento do microrganismo

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a densidade ótica a 620nm com a utilização de um espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, pH e dosagem da atividade da enzima nos filtrados da cultura.

3.5. Atividade enzimática

Amostras em triplicatas (2mL) foram centrifugadas em centrífuga HERMLE-Z 382 K 4500 rpm a 5°C por 15 minutos para obtenção do extrato livre de células. A atividade da protease foi então, determinada nos filtrados da cultura.

Uma mistura contendo 0,5 mL da enzima e 1,0 mL de uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) em tampão Tris-HCl (pH 8,5) foi incubada em banho-maria à 70°C durante 10 minutos. Após este período, a reação foi paralisada pela adição de 0,5mL de ácido tricloroacético 15% (TCA), e esta mistura foi centrifugada a 15000 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi transferido para tubos de ensaio contendo 0,5mL de NaOH 1N, conforme descrito por Janssen et al., (1994). Paralelamente, foi feito um tubo branco que contém todos os reagentes do ensaio, exceto o TCA, que foi adicionado antes do extrato enzimático.

A coloração desenvolvida foi medida em espectrofotômetro SHIMADZU UV-mini 1240, utilizando-se o comprimento de onda de 420nm. Uma unidade da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420 nm igual a 1,0 em 60 minutos (Jansen et al., 1994).

3.6. 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, 20g/L; NaOH 2N, 50mL/L; tartarato de sódio e potássio, 0,2g/L), Reagente B (CuSO₄.H₂O, 5g/L), Reagente C (50 partes do Reagente A e uma parte do Reagente B).

A mistura de reação foi constituída de 40µL da amostra, 360µL de tampão fosfato 50mM (pH 6,5) e 2000µL da solução C. Esta mistura foi agitada vigorosamente. Após o repouso da mesma por 15 minutos, foi adicionado 200µL 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 utilizando comprimento de onda de 750nm.

3.7.Utilização dos resíduos, proteína do soro de leite, água de maceração de milho e melação de cana para a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2.

3.7.1. Influência da concentração da proteína do soro de leite sobre o crescimento e atividade da enzima.

O microrganismo foi cultivado no Meio 1 adicionado da proteína do soro de leite 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 150 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.7.2. Influência da concentração da água de maceração de milho sobre o crescimento e atividade da enzima.

O microrganismo foi cultivado no Meio 1 adicionado da água de maceração de milho nas seguintes concentrações: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 0,7%. 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 150 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.7.3. Influência da concentração do melação de cana sobre o crescimento e atividade da enzima.

O microrganismo foi cultivado no Meio 2 adicionado da água de maceração de milho (0,2%) ou proteína do soro de leite (0,1%) e melação de cana nas seguintes

concentrações: 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5%. Após a esterilização e inoculação do meio de cultura, o mesmo foi incubado por 12 horas a 50°C em um “shaker” rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm. Após este período a densidade ótica da cultura e a atividade da protease foram determinadas.

3.8. Caracterização da enzima bruta

3.8.1. 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 seus respectivos tampões.

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 anteriormente

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

3.8.2. 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 3.5.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando a enzima em temperaturas que variaram de 40 a 100°C com intervalos de 10°C por 1 hora. Após este período de

incubação a atividade residual foi determinada na temperatura ótima da enzima, determinada anteriormente.

3.8.3. Efeito da concentração do NaCl na atividade enzimática

A enzima foi pré-incubada em tampão- fosfato (0,05 M, pH 8,5) contendo várias concentrações de NaCl (0.5 a 5.0 M), a 45° C por 1 e 2 horas. A atividade enzimática foi dosada em todas as concentrações como descrito anteriormente.

4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado no meio contendo proteínas do soro de leite e água de maceração de milho e maltose.

Bacillus sp SMIA-2 cresceu e secretou proteases quando cultivado no meio de cultura contendo os resíduos, proteínas do soro de leite e água de maceração de milho e maltose (Figura 1). A atividade máxima da enzima (52,9 U/mg de proteína) foi alcançada após 16 horas de incubação do microrganismo, quando o crescimento já havia cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária de crescimento. Resultados similares foram encontrados para a protease secretada pelo *Bacillus sphaericus* (Singh et al., 2003).

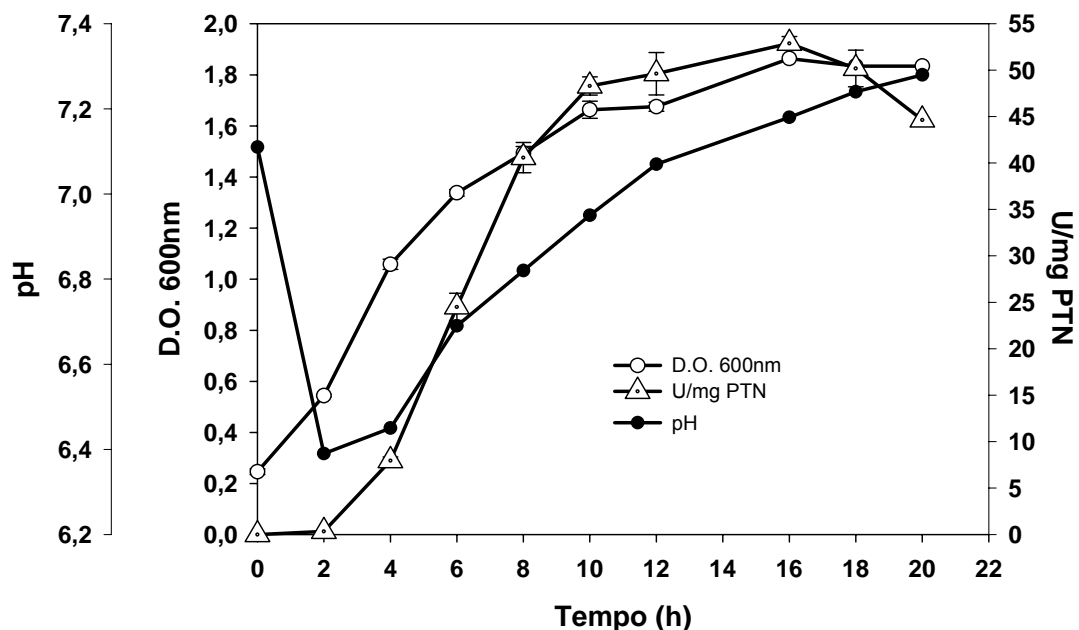


Figura 1 – Crescimento (○), pH (●) e atividade da protease (Δ) por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio contendo 0,1% proteínas do soro de leite, 0,2% de água de maceração de milho e 1% de maltose.

4.1.1. Efeito da concentração da proteína do soro de leite

A concentração da proteína do soro de leite que proporcionou melhor atividade da protease foi 0,1% com níveis de 40,7 U/mg de proteína. O aumento na concentração deste resíduo acima de 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 verificada uma repressão na sua secreção. Não foram observadas grandes alterações no crescimento e nem nos valores do pH nas diferentes concentrações testadas.

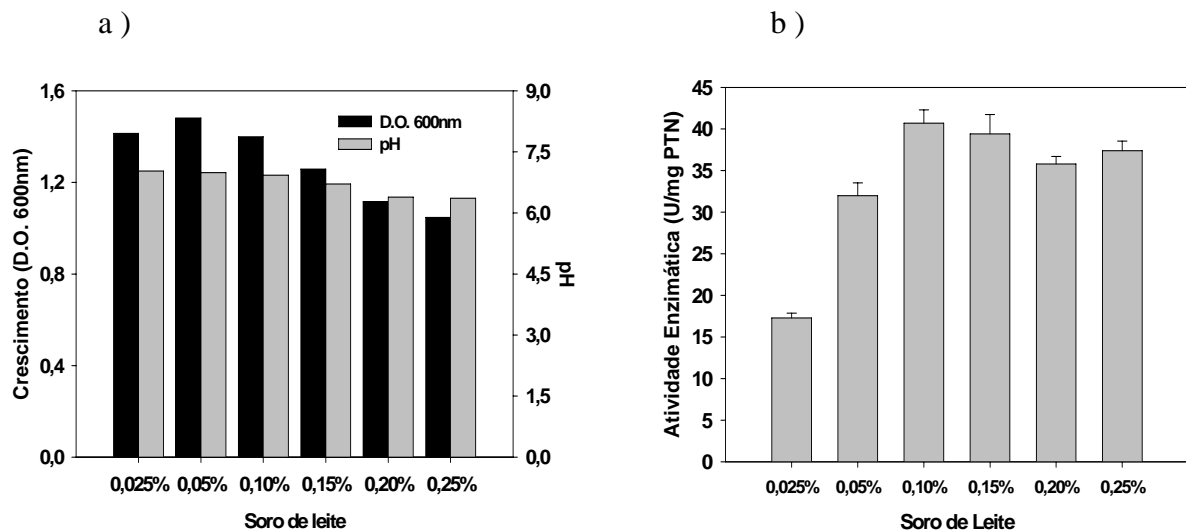


Figura 2 - Efeito da concentração do soro de leite no crescimento (a) e na atividade (b) da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de incubação a 50°C/180rpm e pH inicial 7,5.

Carvalho *et al.* (2008) obteve em seus estudos um aumento na produção de α -amilase, quando o meio de cultivo foi suplementado com 0,25% de água de maceração de milho. A atividade da enzima nesta concentração foi de 61 U/mL, enquanto que sem a suplementação o nível máximo de atividade foi de 34,75 U/mL.

4.1.2. Efeito da concentração da água de maceração de milho

A concentração da água de maceração de 0,2% foi aquela que proporcionou maior atividade da protease com níveis de 58,4 U/mg de proteína, como mostrada na Figura 3. Acima desta concentração, a atividade da enzima foi reduzida. Em relação ao crescimento do microrganismo e dos valores do pH do meio, não foram observadas grandes alterações com a variação das concentrações deste resíduo.

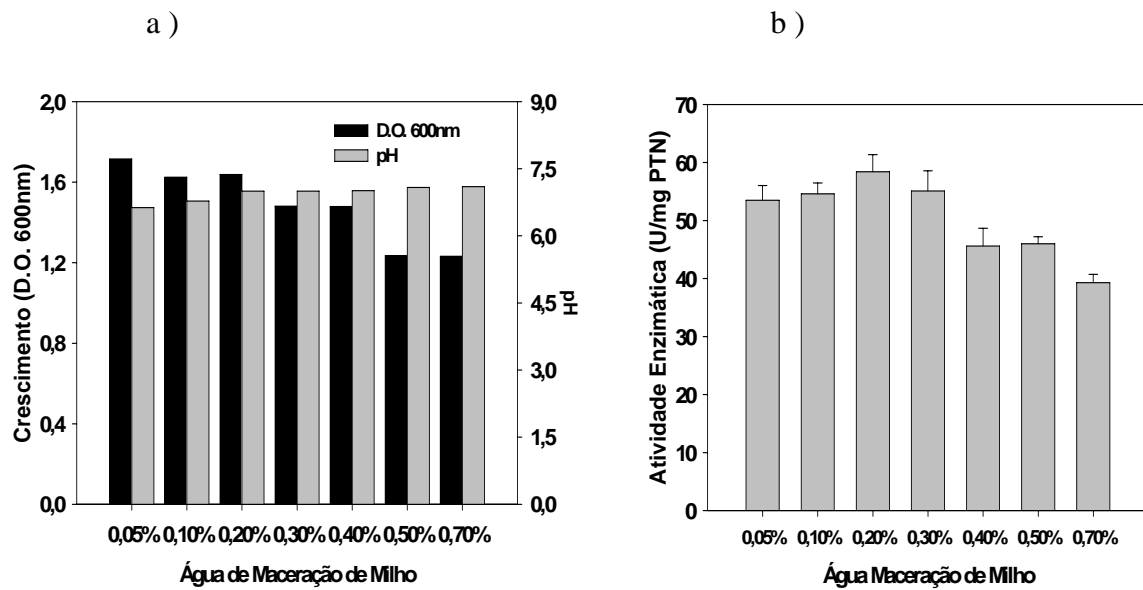


Figura 3 – Efeito da concentração da água de maceração de milho no crescimento (a) e na atividade (b) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 12 horas de cultivo a 50 °C/180rpm e pH inicial 7,5.

Estudos realizados por Nascimento *et al.*, (2007) , mostraram que a substituição do citrato trissódico presentes no meio de cultura pela água de maceração de milho na concentração de 0,5%, proporcionou um aumento da atividade da protease e retardou o processo de desativação que é típico da produção desta enzima. A atividade máxima da enzima obtida foi de 59,5 U/mg de proteína.

4.1.3 Caracterização da enzima bruta em meio de cultivo contendo proteínas do soro de leite e água de maceração de milho e maltose

4.1.3.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A maior atividade da protease foi encontrada em pH 8,5 (35,8 U/mg de proteína). Acima deste valor, foi observada uma redução na atividade da enzima (Figura 4). Estudos revelam que as proteases comerciais de origem microbiana geralmente atingem atividade ótima na faixa de pH de 8,0 a 12.

Os resultados observados para a estabilidade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 ao pH também são mostrados na Figura 4. A maior estabilidade da enzima também foi observada no valor de pH 8,5. Em valores de pH acima de 8,5 a estabilidade da protease foi reduzida.

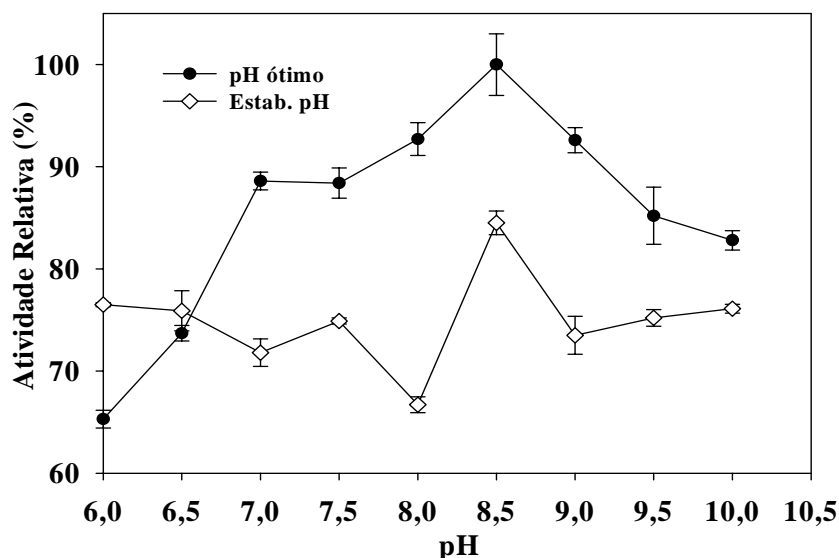


Figura 4: pH ótimo (●) e estabilidade (◇) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 14h de incubação a 50 °C. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada após 2h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH (100% atividade enzimática = 35,8 U/mgPTN).

4.1.3.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease

As temperaturas de 60 °C e 70 °C foram as ótimas para a atividade da protease. Em temperaturas mais elevadas a enzima teve sua atividade reduzida drasticamente, perdendo em torno de 61,3% e 81,6% de sua atividade nas temperaturas de 90 °C e 100 °C, respectivamente (Figura 5).

Em relação a estabilidade térmica da protease, a 40°C e a 60 °C a enzima manteve 95,5% e 79,3% da sua atividade, respectivamente. A 80 °C, a enzima foi completamente inativada.

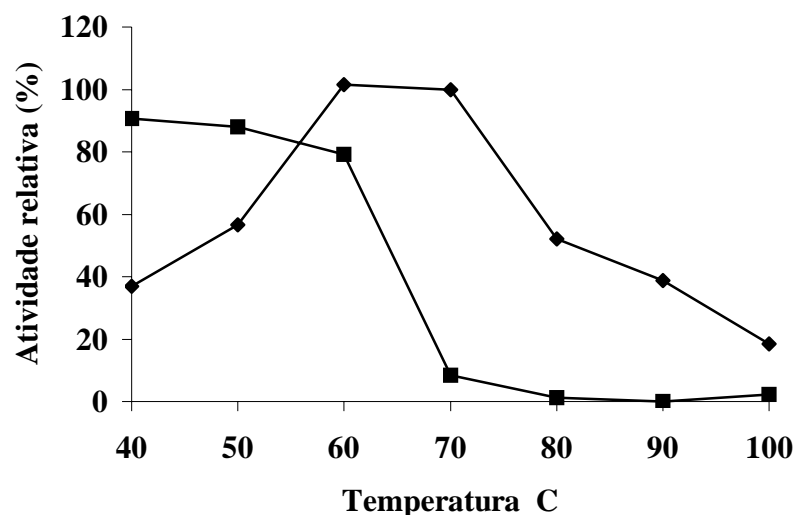


Figura 5: Efeito da temperatura na atividade (♦) e estabilidade (■) da protease, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. A estabilidade térmica foi determinada após a incubação da protease por 1h nas diferentes temperaturas (100% atividade enzimática = 42,64 U/mg de proteína)

Estudos realizados por Nascimento e Martins (2006) revelam que a adição dos metais acarretou um aumento considerável na atividade da protease já nos primeiros 15 minutos de incubação. Na presença dos metais e da glicina a enzima apresentou uma atividade média de 113%, enquanto que na ausência dos mesmos, a atividade residual foi de apenas 50%. Neste estudo a protease quando incubada por 1 hora em presença de cálcio, apresentou uma atividade residual de 73,71% em

presença de cálcio e glicina, 104% em presença de manganês, 94,12% em presença de glicina e manganês, enquanto que a amostra controle apresentou apenas 29,4% de atividade. Isto mostra que a contribuição do manganês foi maior que do cálcio, na estabilidade térmica da enzima.

4.1.3.3. Efeito da concentração do NaCl na atividade da protease

Um estudo sobre o efeito do cloreto de sódio na atividade da protease produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 foi realizado incubando-se a enzima parcialmente purificada a 45°C por 1 e 2 horas em solução de NaCl com concentrações variadas. A atividade da protease foi estimulada pela presença de 0,5M de NaCl quando incubada em 1 hora. Acima desta concentração a atividade da enzima decresceu gradativamente, mantendo 50% de sua atividade inicial nas concentrações de 2,0 a 4,0 M. Na presença de 1,0M e 5,0 M de NaCl, a atividade da protease foi 76% e 37% da atividade máxima respectivamente (Figura 6), quando incubada por 1 hora. Já quando incubada por 2 horas, pode-se verificar que nas concentrações de 0,5 a 2,0 M a enzima manteve aproximadamente 65% de atividade inicial. Observou-se ainda que a enzima manteve cerca de 50% e 48% da atividade original.

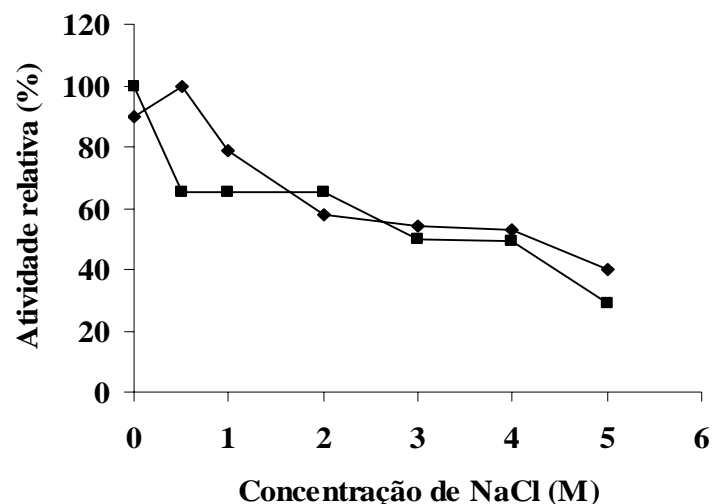


Figura 6: Efeito da concentração de NaCl na atividade da protease, produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 durante 1 hora (◆) 2 horas (■) de incubação a 45°C. Atividade relativa foi expressa como percentual da atividade máxima (100% da Atividade Enzimática = 41 U/mg de proteína).

Resultados semelhantes foram encontrados por Cordeiro et al. (2002) verificaram que a enzima incubada em solução de NaCl em concentrações de 1,0 M e 5,0 M conservou 70% e 47% da atividade original após 24 horas em temperatura de 25°C, respectivamente, em estudos com α -amilase secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2. Além disso, estudos com *Bacillus* sp. JB-99 manteve 84% e 41% da atividade da protease quando incubada a 45°C na presença de 1,0M e 5M por 2 h, respectivamente.

4.2. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio contendo proteínas do soro de leite, água de maceração de milho e melaço de cana de açúcar.

O perfil do crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 e da atividade da protease em meio líquido contendo 0,5% de melaço de cana de açúcar como fonte de carbono e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite e 0,2% de água de maceração de milho está mostrado na Figura 7.

O crescimento foi iniciado imediatamente após a inoculação do meio de cultura. Entretanto, a secreção da protease foi iniciada somente após 12 horas de crescimento. De acordo com Singh *et al.* (2001), essa produção enzimática depois de um determinado tempo de crescimento, pode estar relacionada à necessidade de uma massa mínima de células, para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas.

A atividade máxima da protease foi alcançada após 30 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 26,73U/mg de proteína, quando o crescimento já havia sido cessado. Portanto, a substituição da maltose pelo melaço de cana não proporcionou aumento na atividade da protease, embora bons níveis de atividade tenham sido encontrados quando este resíduo foi utilizado. Após alcançar o valor máximo, a protease sofreu um rápido processo de desativação.

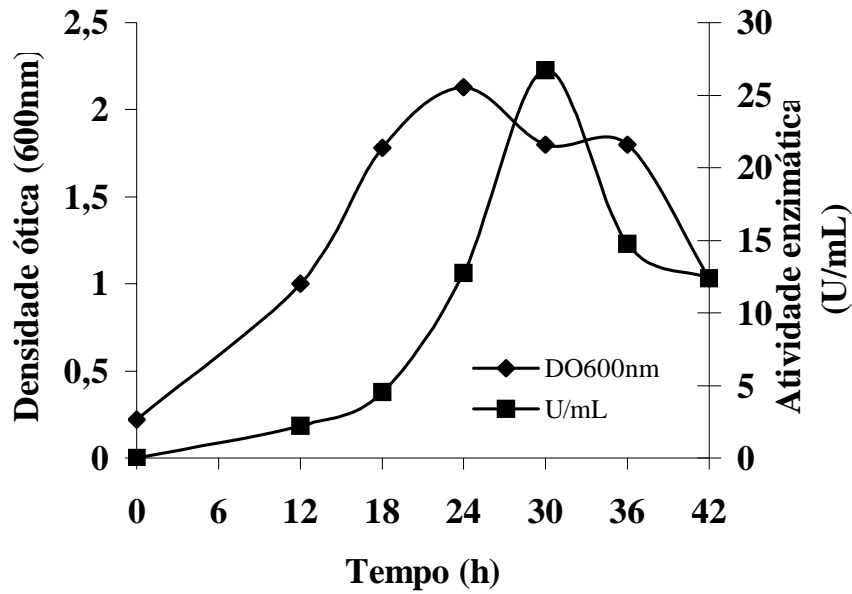
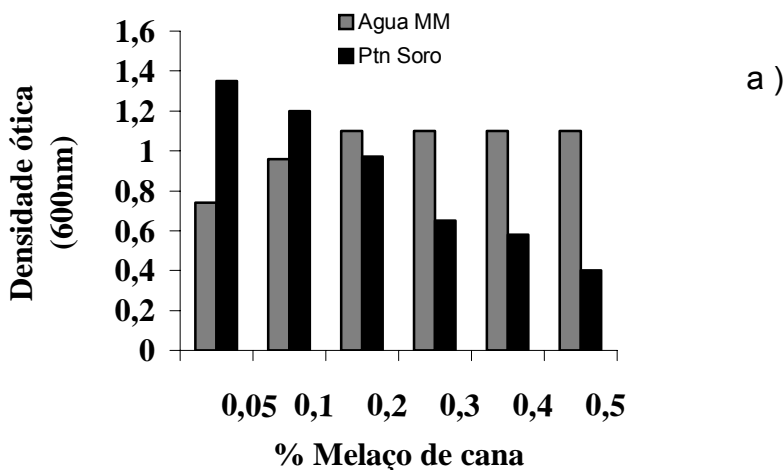


Figura 7. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em 0,5% de melaço de cana e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite e 0,2% de água de maceração de milho a 50°C.

4.2.1. Influência da concentração do melaço de cana na atividade da protease

A adição de várias concentrações de melaço de cana ao meio de cultura contendo a proteína do soro de leite ou a água de maceração de milho foi realizada. As condições que proporcionaram melhores níveis da enzima foram aquelas em que foi utilizado o melaço (0,2%) e a proteína do soro de leite (0,1%) (Figura 8).



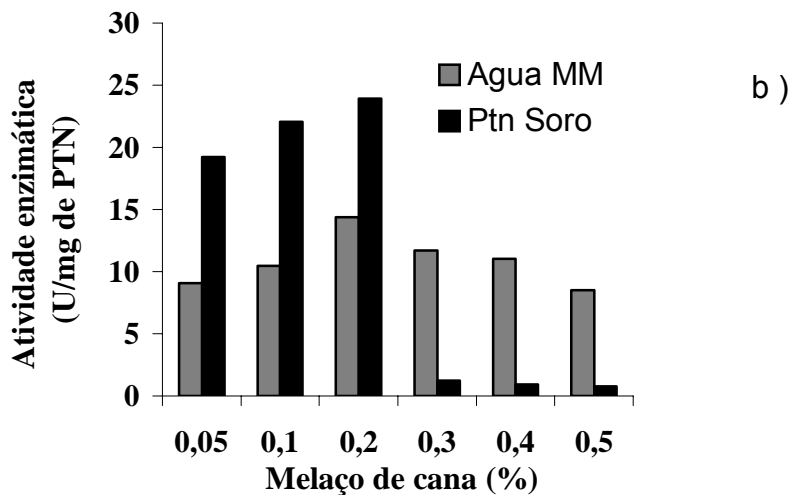


Figura 8. Influência da concentração do melaço de cana no crescimento (a) e na atividade (b) da protease.

4.3. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado no meio contendo proteína do soro de leite e caldo de cana de açúcar.

A substituição do melaço de cana (0,5%) por caldo de cana (0,2%) e a remoção da água de maceração de milho do meio de cultura, promoveu um aumento na atividade da protease (Figura 9). A máxima atividade da enzima (59,38 U/mg de proteína) foi encontrada após 36h de crescimento do microrganismo, quando a cultura se encontrava na fase estacionária. Este valor de atividade foi maior que o encontrado, quando a maltose foi utilizada como fonte de carbono. Estes resultados sugerem a possibilidade do uso do caldo de cana, um substrato de custo mais baixo que a maltose, para a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2.

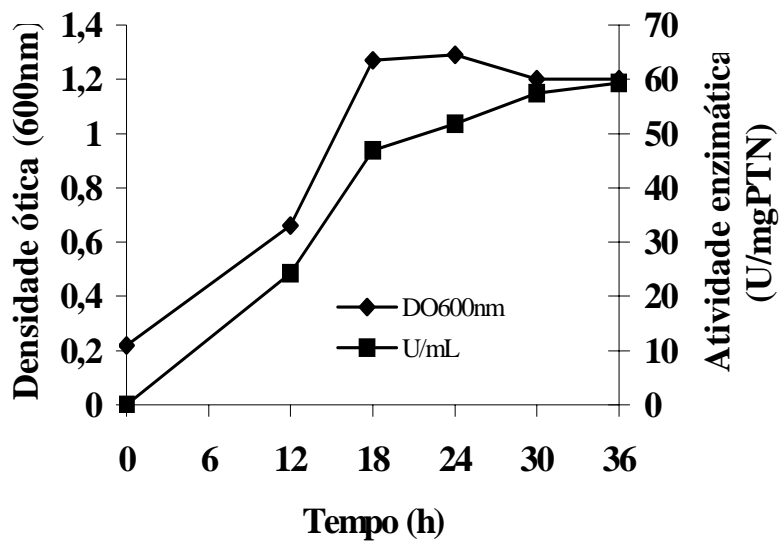


Figura 9. Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em 0,2% de caldo de cana e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite a 50° C.

Em relação ao crescimento do microrganismo, foi observado um ligeiro decréscimo. Isto era esperado devido à remoção da água de maceração de milho. Este resíduo, além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, fornece vários micro-nutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (Kumar e Takagi, 1999).

4.3.1. Influência da concentração do caldo de cana de açúcar na atividade enzimática.

A biossíntese da protease foi reduzida quando baixas concentrações de caldo de cana (0,05%) foram utilizadas no meio de cultura (Figura 10). Portanto, 0,2% foi considerada a melhor concentração do caldo de cana, dentre as testadas, para a atividade da enzima. Em relação ao crescimento do microrganismo, também foi observada uma ligeira redução na densidade ótica da cultura, quando a concentração do caldo de cana foi reduzida para 0,05%.

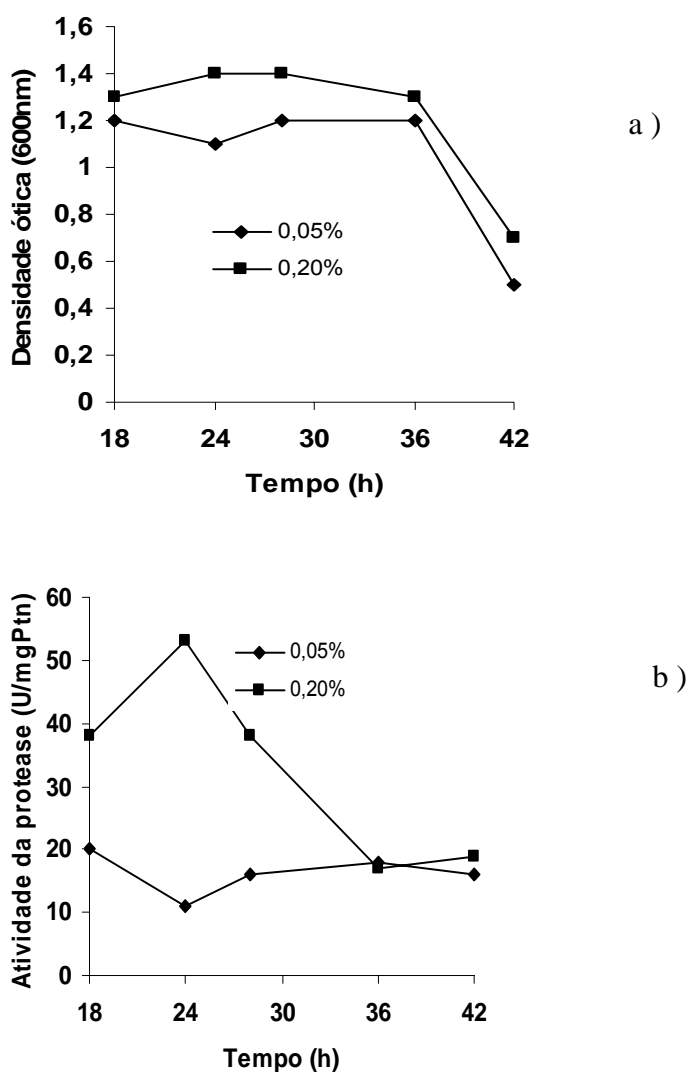


Figura 10. Crescimento (a) e atividade da protease (b) de *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em nas concentrações de caldo de cana de 0,05% e 0,2% e suplementado com 0,1% de proteína de soro de leite a 50° C.

4.4. Caracterização da protease secretada por *Bacillus* sp SMIA-2 em meio de cultura contendo proteínas do soro e caldo de cana.

4.4.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A protease foi ativa em uma ampla faixa de pH, apresentando máxima atividade em pH 8,5 chegando a níveis de 35 U/mg de proteína. Acima deste valor, foi observada uma redução gradativa na atividade da enzima (Figura 11) que em pH

10,5 ainda mantinha 50% de sua atividade inicial. A atividade mais baixa da protease foi encontrada em pH 11,5 e 12,0 que foram os valores mais extremos estudados. Os resultados obtidos por Carvalho et al. (2006) mostram que a α -amilase produzida pelo *Bacillus* sp. SMIA-2 teve pH ótimo encontrado para a enzima foi 8,5. A atividade enzimática em pH 7,0 e 11,0 foram de 72% e 81,4%, respectivamente, em relação ao pH 8,5.

De acordo com BEG e GUPTA (2003), as proteases comerciais de origem microbiana, geralmente, possuem atividade ótima na faixa de pH que varia de 8 - 12, o que as torna de grande interesse para utilização em formulações de detergentes, devido ao pH alcalino destes produtos.

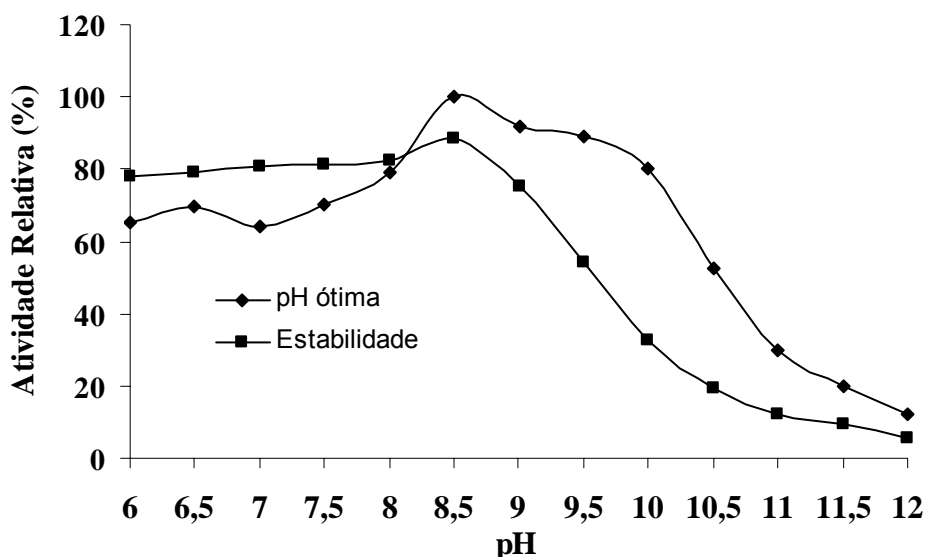


Figura 11. pH ótimo (♦) e estabilidade (■) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 24h de incubação a 50 °C. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada após 2h de incubação do extrato enzimático nos diferentes valores de pH (100% atividade enzimática = 35 U/mg de proteína).

Em relação à estabilidade, a enzima manteve em torno de 80% de atividade quando incubada por 2 horas em temperatura ambiente nos valores de pH de 6,0 - 8,5. A pH 9,5 a enzima mostrou também uma boa estabilidade, mantendo em torno de 50% de sua atividade, em valores maiores a atividade da enzima.

4.4.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease

Estudos sobre a caracterização da protease revelaram que a enzima mostrou uma atividade crescente entre 40°C e 70°C, onde a atividade atingiu seu valor máximo (45 U/mg de Proteína), sendo então 70°C a temperatura ótima da enzima. Acima de 70°C ocorreu uma redução na atividade enzimática e a 90°C e 100°C a protease perdeu cerca de 38% e 80% de sua atividade, respectivamente (Figura 12).

Quanto à estabilidade térmica da protease foi observado que com o aumento da temperatura houve uma redução na atividade enzimática, sendo que a 40°C e a 50°C a enzima manteve mais de 100% de sua atividade. A 60°C e a 70°C foi observada uma redução de 15% e 23%, respectivamente. Na temperatura de 80°C a enzima ainda manteve 60% de sua estabilidade e em temperaturas maiores que 80°C a enzima começou a se desnaturar, mantendo apenas 16 e 9% da sua atividade a 90°C e 100°C, respectivamente.

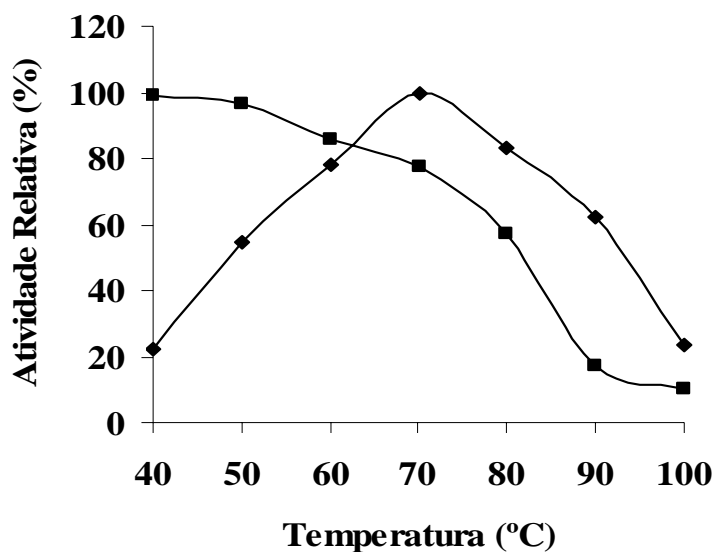


Figura 12: Temperatura ótima (♦) e estabilidade (■) da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 após 24h de incubação a 50°C. A temperatura ótima foi determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. A estabilidade térmica foi determinada após a incubação da protease por 1h nas diferentes temperaturas (100% de atividade = 45 U/mg de Proteína).

5.0. CONCLUSÕES FINAIS

O *Bacillus* sp SMIA-2 foi capaz de crescer e secretar a enzima protease quando cultivado num meio contendo maltose como fonte de carbono e suplementado com proteína do soro de leite e água de maceração de milho. Nestas condições a atividade máxima da enzima alcançada foi de 52,9 U/mg proteína. As melhores concentrações da proteína do soro de leite e da água de maceração de milho para a atividade da enzima foram 0,1% e 0,2%, respectivamente. Nestas condições, a enzima apresentou pH e temperatura para atividade ótima de 8,5 e 70°C, respectivamente.

A substituição da maltose por uma fonte de carbono de custo mais baixo como o resíduo, melaço de cana, não promoveu um aumento na atividade da protease. As melhores condições estabelecidas para a secreção da enzima foram 0,2% de melaço de cana e 0,1% de proteína de soro de leite. Por outro lado, a substituição da maltose pelo caldo de cana (0,2%) promoveu um aumento da atividade da protease, semelhante à obtida quando a maltose foi utilizada como fonte de carbono. Portanto, o caldo de cana pode ser utilizado como uma alternativa para a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2. A enzima secretada nestas condições apresentou atividade ótima em pH 8,0 e temperatura ótima a 70°C.

6.0. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, C.M.M.C.; PEREIRA JR., N.; ANTANIKIAN, G. Extremely Thermophilic Microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298, 1999.
- ANWAR, A.; SALEEMUNDDIN, M. Alkaline Protease: A Review. *Bioresource Technology*. 64:175-183, 1998.
- ARULMANI, M., APARANJINI, K., VASANTHI, K., ARUMUGAM, P., ARIVUCHELVI, M., KALAICHELVAN, P.T. Purification and partial characterization of serine protease from thermostable alkalophilic *Bacillus laterosporus*-AK1. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23: 475–481, 2007.
- BANERJEE, U. C., SANI, R.K., AZMI, W., SONI, R. Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry* 35:213-219, 1999.
- BANIK, R. M.; PRAKASH, M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*. 159:135-140, 2004.
- BEG, Q. K.; GUPTA, R. Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32:294-304, 2003.
- BEG, Q.K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R. De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. *Process Biochemistry*. 78:289-295, 2002.

- BANIK, R. M.; PRAKASH, M. Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*. 159:135-140, 2004.
- CARVALHO, R. V.; CORRÊA T. L. R.; SILVA, J. C. M.; MANSUR, L. R. C. O.; Martins, M. L. L. Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* SP. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39:102-107, 2008.
- CARVALHO, R. V.; CORRÊA T. L. R.; SILVA, J. C. M.; VIANA, A. P.; Martins, M. L. L. Otimização das condições de cultivo para a produção de amilases pelo termofílico *Bacillus* sp. e hidrólise de amidos pela ação da enzima. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, 28:380-386, 2008.
- CORDEIRO, C. A. M.; MARTINS, M. L. L.; LUCIANO, A. B. Production and properties of α -amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33:57-61, 2002.
- DEMIRJIAN, D. C., MORÍS-VARAS, F., CASSIDY, C.S. Enzymes from extremophiles. *Process Biochemistry*. 5:144-151, 2001.
- FEIJOO, G.; MOREIRA, M. T.; ROCA, E.; LEMA, J.M. Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*. 23:86-90, 1999.
- FERREIRA, C.L.L.F., MOSQUIM, M.C.A.V. Aproveitamento Tecnológico/ Racional de Efluentes de Laticínios. IN: *III Encontro Divital de Tecnologia de Laticínios*, UFV, Viçosa-MG, 1996.
- FOMENKOVA, N. P., NEVSKAYA, N. A., NIKULIN, A. D., NIKONOV, S. V. Structural aspects of protein thermostability. *Molecular Biology*, 32: 265-272, 1998.

- GODFREY, T.; WEST, S. *Industrial Enzimology*. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p. 1996
- GUPTA, R.; BEG, Q.K.; KHAN, S.; Chauhan, B. An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Appl. Microbiology Biotechnology*. 60:381-395, 2002.
- HAKI, G.D.; RAKSHIT, S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*. 89:17-34, 2003.
- HERNÁNDEZ, M. S.; RODRÍGUEZ M. R.; GUERRA, N. P.; ROSÉS, R. P. Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 33:275-280, 2005.
- HOUGH, D. W.; DANSON, M.J.. Current opinion in chemical Biology, *Extremozymes* 3: 39-46, 1999.
- HORIKOSHI, K. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 735-750, 1999.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY
Enzyme Nomenclature, *Academic Press*, Orlando, 1992.
- JOHNVESLY, B.; NAIK, G.R. Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process. Biochemistry*, 37: 139-144, 2001.
- JOO, H.S. ; CHANG, C.S. Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263-1270, 2005.

KASHYAP, D.R., VOHRA, P. K., CHOPRA, S. AND TEWARI, R. Applications of pectinases in the commercial setor : a review. *Bioresource Technology*, 77(3): 215-227, 2001.

KONA, R.P.; QURESHI, N; PAI, J.S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*, v 78, p. 123-126, 2001.

KOSIKOWSKI, F.V. Our Industry Today. *J. Dairy Science*. 62:1149-1160, 1979.

KRISTINSSON, H. G.; RASCO, B.A. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 40 (1), 43-81, 2000.

KUMAR, C.G.; TAKAGI, H. Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594, 1999.

LEE, P.C.; LEE, S.Y.; HONG, S.H.; CHANG, H.N. Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess Biosyst Eng*. v 26:63-67, 2003.

LIAO, H., MC KENZIE, T. E HAGEMAN, R. Isolation of a thermostable enzyme variante by cloning and selection in a thermophile. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83: 576-580, 1986.

MAURER, K. H. Detergents proteases. *Current opinion in Biotechnology*. 15:330-334, 2004.

MADIGAN, M. T., MARTINKO, J. M., PARKER, J., BROCK, T. D. *Biology of microorganisms*: 8. ed. New Jersey: Ed. Prentice-Hall, 986 p., 1996.

- MERHEB, C.W., CABRAL, H., GOMES, E., DA-SILVA, R. Partial characterization of protease from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*, and its hydrolytic activity on bovine casein. *Food Chemistry*, 104: 127–131, 2001.
- MING CHU, I; LEE, C.; LI, T.S. Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microbial. Technology*. V. 14, p. 755-761, 1992.
- MUSSATO, S.I., FERNANDES, M., MILAGRES, A.M.F. Enzimas: Poderosa ferramenta na indústria. *Ciência Hoje*, 41: 28-33, 2007.
- NASCIMENTO, W.C.A., MARTINS, M.L.L. Produção de proteases por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido em soro de leite e água de maceração de milho e compatibilidade das enzimas com detergentes comerciais. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26: 582-588, 2006.
- NASCIMENTO, W.C.A., CARVALHO, R. V.; SILVA, C. R.; MARTINS, M.L.L. Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp. termofílico. *Ciência Tecnologia de Alimentos*. 27:417-421, 2007
- NOVOZYME. Disponível em: <http://novozyme.com> . Acessado em: agosto de 2002.
- NUNES, A. S. Influência da temperatura sobre os requerimentos nutricionais de um *Bacillus* sp. termofílico. Tese (Mestrado em Produção Vegetal) – Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 63p. 2000.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MOHAN, R. Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresouce Technology*, Amsterdam 74:81-87, 2000.

PAOLUCCI, A.A.P. Formulação de um meio de cultura a base de soro de queijo para produção de *Lactococcus Lactis* sp *Lactis*. Tese de mestrado, UFV, Viçosa-MG, 1991.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356. 1977.

PHADATARE, S.U.; DESHPANDE, V.V.; SRINIVASAN, M.C. High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enz. Microbiol. Technol.*, 15:72-76, 1993.

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

PRAKASHAM, R.S., RAO, C. S., SARMA, P. N. Green gram husk—an inexpensive substrate for alkaline protease production by *Bacillus* sp. in solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 97: 1449–1454, 2006.

RAO, M.B., TANKSALE, A. M., GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 597-635, 1998

ROMERO, F.J. ; GARCIA, L. A. ; SALAS, J. A. ; DÍAZ, M. ; QUIRÓS, L. M. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcescens* grown in whey. *Process Biochemistry*. 36:507-515, 2001.

- ROSA, M.; MORANA, A.; RICCIO, A. GAMBACORTA, A.; TRINCONE, A.; INCANI, O. Lipids of the archaea: a new tool for bioelectronics. *Biosens. Bioelectr.* 9:669-675, 1994
- SANTOS, H., LAMOSA: P., COSTA, M. S. Extremófilos: microrganismos a prova de agressões ambientais extremas. *Boletim de Microbiologia*, 69: 2-10, 2001.
- SINGH, J.; BATRA, N.; SOBTI, C.R. Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process. Biochemistry.*, 36:781-785, 2001.
- SISO, M. I. G. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57:1-11, 1996.
- STONER., M.R.; DALE, D.A.; GUALFETTI, P.J.; BECKER, T.; MANNING, M.C.; CARPENTER, J.F.; RANDOLPH, T.W. Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizer and protease inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*. 34:114-125, 2004.
- TAVARES, V. B., SIVIERI, K., CERON, C.R., SILVA, R., TRABUCO, E., LOMBARDI, F. R., GOMES, E. Utilização do Resíduo Líquido de Indústria de Processamento de Suco de Laranja Como Meio de Cultura de *Penicillium Citrinum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. *Química Nova*. 21:722-725, 1998.
- TEHEI, M., ZACCAI, G. Adaptation to extreme environments: Macromolecular dynamics in complex systems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1724: 404-410, 2005.
- TOLNER, B.; POOLMAN, B.; KONINGS, W.N. Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.118A. 3:423-428, 1997

ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H.K; STARNES, R.L. (1991). Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*. 8:71-82, 1991.

WARD, O. P.; YOUNG, M. M. Thermostable Enzymes. *Biotech. Adv.* 6:39-69, 1998.

WISEMAN, A. (1985). *Manual de Biotecnologia de los enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.