

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
TERMORRESISTENTES SECRETADAS POR *Bacillus* sp SMIA-2
EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO SUBSTRATOS DE
BAIXO CUSTO

NATIELE OLIVEIRA GENTIL

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – DARCY
RIBEIRO

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO DE 2014

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
TERMORRESISTENTES SECRETADAS POR *Bacillus* sp SMIA-2
EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO SUBSTRATOS DE
BAIXO CUSTO

NATIELE OLIVEIRA GENTIL

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

Orientador: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
AGOSTO DE 2014

PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PROTEASES
TERMORRESISTENTES SECRETADAS POR *Bacillus* sp SMIA-2
EM CULTURAS SUBMERSAS CONTENDO SUBSTRATOS DE
BAIXO CUSTO

NATIELE OLIVEIRA GENTIL

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

Aprovada em 07 de agosto de 2014

Comissão Examinadora

Silvania Alves Ladeira (D.Sc., Produção Vegetal) – Universidade São Camilo

Adriane Nunes de Souza (D.Sc., Ciências) – FAETEC

Prof. André de Oliveira Carvalho (D.Sc., Biociências e Biotecnologia) – UENF

Prof^a. Meire Lelis Leal Martins (D.Sc., Engenharia Agrícola) – UENF
(Orientadora)

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 007/2015

Gentil, Natiele Oliveira

Purificação parcial de proteases termorresistentes secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo / Natiele Oliveira Gentil. – 2015.

58. : il.

Orientador: Meire Lelis Leal Martins.

Dissertação (Mestrado - Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2015.

Bibliografia: f. 48 – 58.

1. Enzima 2. Resíduos 3. Termofílico 4. Bactéria 5. Pureza I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 664

Dedico esta conquista aos meus pais,

Antonio Gentil Filho e Regina Célia da Costa Oliveira Gentil

Que por mim fizeram todo o possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, porque sem Ele nada disso poderia ter ocorrido, e nada eu teria conquistado;

À minha Orientadora Meire Lelis Leal Martins por ter confiado esse trabalho a mim, por estar sempre disposta a me ouvir e orientar meus passos durante toda essa experiência acadêmica;

A Universidade por disponibilizar o espaço físico para a realização deste trabalho e a FAPERJ pelo financiamento do projeto de pesquisa e fornecimento da minha bolsa;

Agradecimento algum que eu escrevesse neste espaço limitado poderia transcrever minha gratidão ao Professor André de Oliveira Carvalho por TUDO que fez por mim, pelo meu trabalho e por essa concretização. Não só pelo espaço físico de seu laboratório, mas a disponibilização do seu tempo, por compartilhar suas experiências, seus conhecimentos, disponibilizar seus orientados para me ajudar. Todo aprendizado durante esses 24 meses eu devo a ele, um professor sem igual;

Não poderia deixar de agradecer a todos os integrantes e agregados do Laboratório de Tecnologia de Alimentos (Ana Lúcia, João Batista, Erica Cruz, Patrícia Rodrigues, Silvania Ladeira, Andreia Delatorre) por toda ajuda direta ou indireta que me ofereceram. E agradeço também a todas as meninas no LFBM, do grupo do André (Julia Fardim, Maria Eliza Brambila, Géssika Silva, Flávia

Camila, Júlia Soares) por vocês dividirem comigo o seu ambiente de trabalho, por me aceitarem, por me ajudarem, por me receberem sempre bem;

Deixo meu reconhecimento a todos os meus familiares, que entendem sempre minha ausência, mas que mesmo assim mandam força para mim, me apoiam, e me incentivam. Amo todos vocês, em especial meus irmãos (Nataniel Gentil e Luciana Ribeiro);

Aos meus amigos de infância, de colégio, de graduação. A todos aqueles que mandam energias positivas. Principalmente Daniele Ferreira, que acompanhou toda essa minha caminhada, que junto comigo conquistamos nossos objetivos e ao Helio Secco, que nunca deixou qualquer distância esfriar nossa amizade;

A Clara Dansa, que nesse finalzinho acompanhou de mais perto, por todos os cafés, por todos os almoços, por toda força, todo apoio, pelas vezes que eu dizia ser incapaz, e você me mostrava a força que habita em nós mulheres.

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1.0 INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Micro-organismos Termofílicos	15
2.1.1 Gênero <i>Bacillus</i>	17
2.2 Enzimas	18
2.2.1 Termoenzimas	19
2.2.2 Enzimas Proteolíticas	21
2.2.3 Aplicação de proteases	23
2.3 Utilização de Resíduos Agroindustriais como substratos.....	25
2.4 Separação e Purificação de Enzimas	27
3.0 OBJETIVOS	30
4.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1 Micro-organismo e condições de cultura	31
4.2 Obtenção da enzima	31
4.2.1 Meio de cultura	31
4.2.2 Preparo do pré-inóculo de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	32
4.2.3 Fermentação	32
4.3 Determinação da atividade proteásica	32
4.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis	33
4.5 Purificação da Enzima	33
4.5.1 Precipitação com sulfato de amônio	33

4.5.2 Cromatografia de afinidade	34
4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	34
4.5.4 Zimograma	35
4.5.5 Determinação da classe de proteases	35
4.5.6 Cromatografia de fase reversa	35
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Perfil do crescimento e atividade da protease secretada pelo <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2	36
5.2 Purificação parcial da protease secretada por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2	38
5.2.1 Precipitação com Sulfato de Amônio	38
5.2.2 Cromatografia de Afinidade	38
5.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	40
5.2.4 Zimograma	41
5.2.5 Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática	42
5.2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	43
5.3 Rendimento da purificação	45
6.0 CONCLUSÕES	47
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

RESUMO

Gentil, Natiele Oliveira, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Julho de 2014. Purificação parcial de proteases termorresistentes secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 em culturas submersas contendo substratos de baixo custo. Orientador: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins.

Algumas enzimas são encontradas facilmente em diferentes micro-organismos do ambiente e estas requerem um destaque especial devido a seu grande valor econômico. As proteases apresentam grande diversidade bioquímica, sendo facilmente manipuláveis, favorecendo dessa maneira suas aplicações biotecnológicas. A cepa *Bacillus* sp SMIA-2 foi cultivada em meio de cultura líquido complementado com proteína do soro de leite e água de maceração de milho a 50°C, onde o melhor tempo para a produção de proteases foi de 36 horas (27,94 U/mg⁻¹). Após a fermentação o extrato fermentado passou por etapas de pré-purificação que consistiu na centrifugação, adição de sulfato de amônio (60% de saturação) e diálise. Essas etapas resultaram em um aumento de aproximadamente nove vezes mais a atividade específica de proteases (256,72 U/mg⁻¹). Para obter uma protease mais pura essa amostra foi usada em uma cromatografia de afinidade, da qual foram coletados dois picos que apresentaram atividade proteásica. Esses picos foram submetidos a teste com inibidores de proteases, que verificou a existência das quatro classes de protease. Foi também feito um SDS-PAGE e um zimograma com os picos coletados, nos quais observou-se bandas proteicas com atividade proteásica de tamanho variando de 24 kDa a 45 kDa.

Para um maior grau de pureza, o pico eluído da resina de afinidade foi submetido à cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC, que resultou em sete picos coletados, nos quais cinco deles apresentaram atividade enzimática. Porém, um dos picos coletados foi mais representativo em relação à atividade proteica, pois apresentou uma atividade enzimática de 116,4 U/mL e dosagem de proteína de 0,095 mg/mL. Estes resultados mostraram uma relativa purificação da enzima de interesse, com um fator de purificação de 43,87 vezes. Entretanto, para obter a protease pura, ainda será necessário a repetição de experimentos e continuidade de outros passos de purificação.

ABSTRACT

Gentil, Natiele Oliveira, M.Sc., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. July, 2014. Partial purification of heat resistant proteases secreted by *Bacillus* sp SMIA-2 in submerged cultures containing low-cost substrates. Advisor: Prof^a. Meire Lelis Leal Martins.

Some enzymes are easily found in different microorganisms from the environment and a special mention due to its high economic value. Proteases present great biochemical diversity, being easily manipulated, thus favoring their biotechnological applications. The strain *Bacillus* sp SMIA-2 was grown in liquid medium supplemented with whey protein and water corn steep liquor at 50°C, where the best time for the production of proteases was 36 h (27.94 U/mg⁻¹). After fermentation the fermented extract underwent pre-purification steps which consisted of centrifugation, addition of ammonium sulfate (60% saturation) and dialysis. These steps resulted in an increase of approximately nine times more specific protease activity (256.72 U/ mg⁻¹). For a more pure protease that sample was used an affinity chromatography, from which were collected two peaks showed that protease activity. These peaks were subjected to protease inhibitor test, which confirmed the existence of four proteases classes. It was and also made a SDS-PAGE and zymogram with the collected peaks, in which there was observed protein bands with protease activity ranging from 24 kDa and 45 kDa . For higher purity, the retained peak eluted from the affinity resin was subjected to chromatography on a reversed phase HPLC system, which resulted in seven peaks collected, in which five of them showed enzymatic

activity. However one of the most representative peak, in regard to protease activity, showed an enzyme activity of 116.4 U / ml and dosage of 0.095 mg protein/mL. These results showed the relative purification of the enzyme of interest, with a purification factor of 43.87 times. However in order to obtain pure protease, repetition of experiments and continuity of other purification steps will be needed.

1.0 INTRODUÇÃO

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais (Singh *et al.*, 2000) e são responsáveis por aproximadamente 60% do mercado mundial de enzimas (Ng e Kenealy, 1986; Kalisz, 1988; Rao *et al.*, 1998). Indústrias nas quais as proteases são utilizadas incluem a indústria farmacêutica, de couro, de manufatura de hidrolisados de proteínas, na produção de combustíveis e agentes químicos, produção de biogás, indústria de alimentos, indústria de detergentes entre outros (Pastor *et al.*, 2001).

Entre as várias proteases, as de origem bacterianas são as mais significantes, se comparadas com as proteases de fungos e animais (Ward, 1985). Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* sp. se destacam como os produtores específicos de proteases extracelulares (Priest, 1977).

Atualmente a escolha de novos micro-organismos produtores de proteases é talvez o maior obstáculo na comercialização destas enzimas. Sendo assim, a escolha de linhagens de micro-organismos apropriados, juntamente com a escolha de substratos diversificados e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, podem levar a uma melhor produção enzimática, além de reduzir os custos de produção.

A indústria de alimentos produz ao longo de sua cadeia uma grande quantidade de resíduos agroindustriais, o que gera perda de divisas, além de inúmeros problemas ambientais. No entanto, o aproveitamento integral desses resíduos como matéria-prima para a formulação de rações, dentre outras

finalidades, tem como objetivo principal agregar valor aos subprodutos (Sena e Nunes, 2006).

A bactéria termofílica *Bacillus* sp cepa SMIA-2, que foi utilizada neste trabalho, produziu proteases em diferentes condições de crescimento (Nascimento e Martins, 2004). Tendo em vista que o substrato para o crescimento do micro-organismo responde por 30-40% do custo da produção de enzimas em escala industrial (Joo e Chang, 2005), Ladeira *et al.* (2010) e Ladeira *et al.* (2012) estudaram alternativas a fim de baratear o processo de produção desta enzima como a utilização de resíduos agroindustriais. Corrêa *et al.* (2011), verificaram que as proteínas do soro de queijo e a água de maceração de milho foram excelentes substratos para a produção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Micro-organismos Termofílicos

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

Micro-organismos capazes de crescer em temperaturas altas são chamados micro-organismos termofílicos ou termófilos e são classificados em: termófilos moderados, em que a faixa de temperatura de crescimento está entre 20° e 25°C; termófilos extremos, cujo crescimento se dá em temperaturas de 65° a 85°C; ou ainda hipertermófilos, quando crescem entre 85° até 110°C. Os micro-organismos termófilos moderados podem ser encontrados dentro dos domínios *Bacteria*, *Archaea* e *Eukarya* (fungos filamentosos); os micro-organismos termófilos extremos são encontrados dentro dos domínios *Bacteriae Archaea*; e os hipertermófilos apenas são encontrados dentre o domínio *Archaea* (Madigan e Oren, 1999).

A adaptação de um determinado micro-organismo à termofilia envolve a adaptação da membrana citoplasmática, das proteínas e do DNA às temperaturas acima da faixa mesofílica. Essa adaptação tem despertado grande interesse na biotecnologia, considerando que os mecanismos de termorresistência das biomoléculas desses micro-organismos podem constituir

modelos interessantes para a bioengenharia ou, ainda, o uso direto das mesmas em bioprocessos (Gomes *et al.*, 2007).

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

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

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

2.1.1. Gênero *Bacillus*

Segundo o *Manual Bergey's de Bacteriologia Sistemática* (Sneat *et al.*, 1986), os *Bacillus* são bactérias em forma de bastonetes, Gram-positivas, formadoras de esporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas e a maioria é catalase positiva. São agrupadas de acordo com as exigências físicas, químicas, nutricionais ou genéticas. Dentro do gênero *Bacillus*, o grupo *Bacillus subtilis* é reconhecido por englobar cinco espécies fisiologicamente similares (Gordon *et al.*, 1973): *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. subtilis*. Embora essas bactérias sejam fenotipicamente muito similares, elas podem facilmente ser distinguidas por estudos do DNA (Sekiand Oshima, 1989).

O gênero *Bacillus* é um dos maiores da microbiologia. Suas características são muito variadas, sendo encontradas espécies com importância industrial e agrícola e espécies patogênicas produtoras de toxinas (Paiket *et al.*, 1997).

Bacillus são organismos com atrativo industrial por possuírem diversas características vantajosas, tais como: sua alta taxa de crescimento, levando a um curto tempo para a fermentação; sua capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular e o estado GRAS (do inglês, Generally Recognized As Safe), considerado pelo FDA (do inglês, Food and Drug Administration) de algumas espécies como *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* (Schallmey *et al.*, 2004), as quais são muito próximas, filogeneticamente, de *Bacillus amyloliquefaciens*. Estes organismos são uma fonte muito importante de enzimas extracelulares utilizadas industrialmente, incluindo proteases e amilases.

Este gênero é atualmente considerado como um dos maiores produtores de enzimas industriais, incluindo espécies encontradas na natureza (solo, água e ar), e algumas como participante da biota intestinal (Chantawannakul *et al.*, 2002).

2.2. Enzimas

Enzimas são proteínas com atividade catalítica, isto é, exercem a função de acelerar ou mesmo possibilitar reações entre componentes químicos. Estão presentes em todos os sistemas biológicos e são produzidas por todos os organismos vivos e têm a capacidade de atuar fora do meio celular. Constituem o principal alvo da pesquisa em Biotecnologia, não apenas por seu papel crucial nos mecanismos celulares, mas também por seu potencial de aplicação na substituição de processos químicos convencionais (Do Canto e Menezes, 1995).

As enzimas, também denominadas de biocatalisadores, possuem características particulares pela sua alta eficiência em condições fisiológicas e alta especificidade, sendo inclusive capazes de catalisar reações estereo-específicas. Este potencial catalítico é utilizado industrialmente não só nos clássicos processos fermentativos, mas também em processos de biotransformações microbianas para a catálise de reações químicas de difícil ocorrência e de grande importância na indústria farmacêutica (Madigan *et al.*, 1999).

As enzimas podem ser classificadas em intracelulares ou extracelulares. As intracelulares são produzidas dentro das células e permanecem no citoplasma, são utilizadas quando não há outra forma de síntese, principalmente quando se necessita de replicação do DNA. Porém, as mais utilizadas industrialmente são as extracelulares, que são sintetizadas no ribossomo próximo à membrana celular e transferidas para o meio extracelular. Assim, são retiradas do meio do cultivo, tendo como principal vantagem de não haver risco de contaminação por outras moléculas (Bourgaize *et al.*, 2000).

As enzimas de origem microbiana possuem muitas vantagens sobre as equivalentes de origem animal ou vegetal, como o menor custo de produção, a possibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, além de oferecer um amplo espectro de características físico-químicas. Apesar disso, enzimas com o mesmo perfil de atuação sobre o substrato podem apresentar funcionamento ótimo em pH, temperatura e concentração iônica

diferentes, o que requer a triagem de enzimas adequadas às condições nas quais serão utilizadas. Portanto, a identificação de novas fontes microbianas, principalmente não tóxicas ao organismo humano, é de grande interesse estratégico, pois além de garantir o suprimento de enzimas aos mais variados processos industriais, tornam possível o desenvolvimento de novos sistemas enzimáticos que não podem ser obtidos de plantas ou animais (Oliveira *et al.*, 2005).

A variedade de enzimas microbianas e seus ramos de aplicação somada com a necessidade de utilização de processos industriais menos agressivos para o meio ambiente, justificam a pesquisa e produção de enzimas (Mussatto *et al.*, 2007).

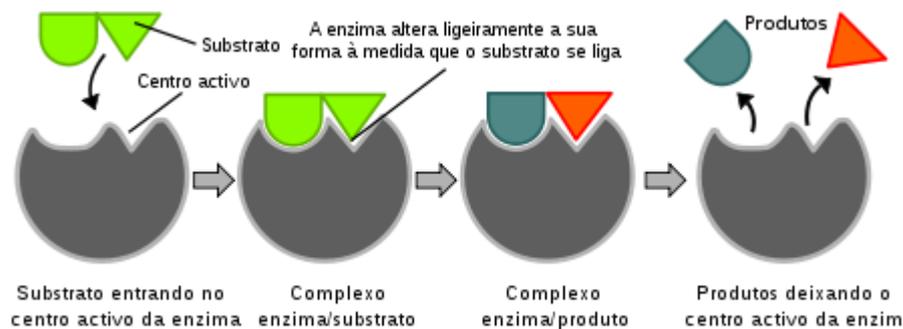


Figura 1: Ilustração do mecanismo de ação das enzimas

2.2.1. Termoenzimas

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

As proteínas de micro-organismos termófilos apresentam sequências de aminoácidos, estrutura tridimensional e mecanismos catalíticos idênticos aos de suas similares mesofílicas. Algumas diferenças na composição de aminoácidos, nos mecanismos de manutenção do enovelamento e da estabilização da estrutura foram constatadas entre enzimas de mesófilos e termófilos, porém, os fatores de pressão seletiva (pressão, pH, temperatura) e as variações filogenéticas devem ser considerados (Niehaus *et al.*, 1999).

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

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

A elevada rigidez intrínseca da proteína termofílica, decorrente da estabilidade do enovelamento, requer alta temperatura de atividade (maior que 40°C) para promover o movimento térmico e o aumento da flexibilidade essencial para a atividade catalítica, ou seja, a adaptação da proteína às temperaturas extremas parece ser resultado de um equilíbrio entre o aumento da rigidez responsável pela estabilidade térmica e a flexibilidade requerida para exercer sua função fisiológica (Shiraki *et al.*, 2001). Outra característica das enzimas termoestáveis é sua maior resistência à ação de proteases, uma vez que, quanto mais rígida for a molécula, menos expõe seu sítio de proteólise (Gomes *et al.*, 2007).

As enzimas termoestáveis, de maneira geral, apresentam vantagens para a aplicação na indústria, visto que processos biotecnológicos conduzidos

em elevadas temperaturas têm o risco de contaminação por micro-organismos mesófilos significativamente reduzidos (Haki e Rakshit, 2003). As temperaturas mais elevadas favorecem a solubilidade de substratos e produtos, e aumentam as taxas de reação por redução da viscosidade e por aumento do coeficiente de difusão dos substratos (Egorova e Antranikian, 2005). Adicionalmente, a utilização de temperaturas mais altas faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando de uma menor quantidade de enzima, pois um aumento de 10°C na temperatura promove um aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade da reação (Zamost *et al.*, 1991).

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

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

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

2.2.2 Enzimas proteolíticas

Proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. O processo é chamado de clivagem proteolítica, e é um mecanismo comum de

ativação ou inativação de enzimas envolvidas principalmente na digestão e na coagulação sanguínea. Como uma molécula de água é utilizada no processo, as proteases são classificadas como hidrolases (Santos, 2007).

Com base na sequência de aminoácidos, as proteases são classificadas em diferentes famílias, subdivididas em clãs, que reúnem grupos de proteases que divergiram de um ancestral comum. Proteases que atuam restritamente em peptídeos intermediários são conhecidas como “peptidases” e as que agem diretamente em proteínas ou cadeias polipeptídicas longas, como “proteinasas” (Grassmann e Dyckerhoff, 1928).

As proteases são classificadas em dois grupos principais, que são as exopeptidases (EC 3.4.11-19) e endopeptidases ou proteinases (EC 3.4.21-99), dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína. As exopeptidases iniciam o processo de degradação a partir das extremidades amino (N) ou carboxi-terminal (C) das proteínas, produzindo pequenos peptídeos ou mesmo aminoácidos. As endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades amino- e carboxi-terminal, gerando dessa forma, peptídeos maiores. Baseado no tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, as carboxipeptidases foram subdivididas em serina-, metalo-, e cisteína- carboxipeptidases e as endopeptidases são ainda classificadas em quatro relevantes grupos, que são: serina (EC 3.4.21), cisteína (EC 3.4.22), aspártico (EC 3.4.23) e metalo (EC 3.4.24) proteases. Sendo que as serina peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteína-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico.

Ainda que presentes em uma variedade de organismos vegetais e animais são os micro-organismos a fonte atrativa potencial de proteases, devido ao seu rápido crescimento, ao espaço limitado exigido para o seu cultivo, à diversidade bioquímica e à facilidade de manipulação genética (Rao *et al.*, 1998; Haki e Rakshit, 2003). Portanto, as proteases de maior valor industrial são aquelas obtidas principalmente de micro-organismos (Joo e

Chang, 2005). As enzimas proteolíticas termoestáveis produzidas por micro-organismos do gênero *Bacillus* são o grupo mais importante de enzimas produzidas comercialmente e representam cerca de 20% do total de proteases comercializadas no mundo, sendo sua aplicação predominante (35%) na indústria de detergentes (Beget *et al.*, 2002).

As proteases intracelulares são importantes para vários processos metabólicos e celulares, como na esporulação, diferenciação e manutenção do “pool” de proteínas intracelulares, enquanto que as proteases extracelulares são importantes para a hidrólise de proteínas no meio externo, permitindo a absorção dos nutrientes pelos micro-organismos (Gupta *et al.*, 2002).

De acordo com Gacesa e Hubble (1990) e Wiseman (1985) as enzimas extracelulares possuem uma série de vantagens sobre as intracelulares. Primeiro por serem secretadas no meio de cultura, não requerem técnicas de ruptura celular que são difíceis de aplicação em larga escala. Segundo, porque o número de enzimas secretadas é limitado sendo relativamente fácil separar a enzima de interesse no meio de crescimento e por fim, as enzimas extracelulares são mais compactas, sendo menos susceptíveis à desnaturação que as intracelulares.

2.2.3. Aplicações de proteases

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

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

Apesar do alto custo da utilização de enzimas, suas vantagens em diversos campos são tão óbvias que uma variada gama de indústrias as utiliza em seus processos, movimentando um mercado de aproximadamente U\$ 2,3 bilhões (Mussato *et al.*, 2007). As enzimas proteolíticas, principalmente as alcalinas, correspondem a 60% desse montante (Banerjee *et al.*, 1999; Merheb *et al.*, 2007), sendo que 40% deste valor são de fontes microbianas (Gupta *et al.*, 2002) e cerca de 35% respondem pelas proteases que são aplicadas na indústria de detergentes (Hadj-Ali, 2007).

Tabela 1: Aplicações industriais das enzimas microbianas.

Fonte	Enzima	Aplicação Industrial
<i>Aspergillus niger</i>	Proteases ácidas e neutras	Queijo, carnes, pescado, cereais, bebidas
<i>Aspergillus oryzae</i>	Proteases ácidas e neutras	Hidrólise proteica, processamento de carne e pescado, indústria de cervejeira e de panificação
<i>Aspergillus melleus</i>	Proteases alcalinas	Manufatura de queijo
<i>Bacillus licheniformis</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	Proteases alcalinas	Fabricação de detergentes e indústria de couro, processamento de carnes, pescados e derivados lácteos
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i>	Protease neutra	Produção de bebidas e panificação

Fonte: Wiseman (1991)

As proteases têm uma grande variedade de aplicações, principalmente nas indústrias de detergentes e alimentos. Em vista da recente tendência do desenvolvimento de tecnologias ambientais, as proteases são utilizadas no tratamento de couro e em vários processos de biorremediação. As proteases são um dos ingredientes padrão adicionado a todos os detergentes devido, principalmente, à especificidade em relação a alguns substratos constituintes do material a ser removido. Na indústria de alimentos são amplamente utilizadas em laticínios, massas e na produção de hidrolisados proteicos. Na indústria farmacêutica, as proteases são utilizadas em formulações como

auxiliares digestivos, combinações com antibióticos e para tratamentos de lesões. No entanto, essas proteases são produzidas em pequenas quantidades e requerem alto grau de pureza (Rao *et al.*, 1998). Na tabela 1 são apresentadas algumas proteases de origem microbiana, bem como suas aplicações industriais.

2.3. Utilização de Resíduos Agroindustriais como substratos

A economia brasileira é uma das mais importantes do mundo baseada na agricultura, produzindo e exportando café, cana-de-açúcar, soja, mandioca, frutas entre outros. Entretanto, a grande produção desses produtos agrícolas gera uma grande quantidade de resíduos, que quando acumulados gera a deterioração do meio ambiente e perda de recursos, com contribuição significativa para o problema da reciclagem e conservação da biomassa (Uenojo e Pastore, 2006).

Segundo PNRS (Política Nacional de Resíduos Sólidos), no Brasil as estimativas da geração de resíduos oriundos das agroindústrias associadas à agricultura representaram cerca de 291,1 milhões de toneladas de resíduos no ano de 2009. Uma das estratégias deste órgão é a estimulação de pesquisas e o desenvolvimento de tecnologias de aproveitamento de resíduos, além de propor metas de redução, reutilização e reciclagem desses resíduos.

Nas últimas décadas há uma crescente busca da utilização dos resíduos agroindustriais, devido à incessante demanda das atividades agrícolas. Diversos processos são desenvolvidos para utilização desses materiais, transformando-os em compostos químicos e produtos com alto valor agregado como álcool, enzimas, ácidos orgânicos, aminoácidos, entre outros. (Pandey e Soccol, 1998; Pandey *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2000).

Segundo Demajorovic (1995), resíduos sólidos diferenciam-se do termo lixo, pois enquanto este último não possui nenhum tipo de valor, já que é aquilo que deve apenas ser descartado, os resíduos possuem valor econômico agregado por possibilitarem o reaproveitamento no próprio processo produtivo.

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

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.*, 2000).

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

A produção industrial de enzimas é frequentemente limitada devido aos custos dos substratos utilizados para o cultivo dos micro-organismos. Estima-se que por volta de 30-40% do custo envolvido na produção de proteases seja devido ao meio de cultura utilizado para o crescimento dos micro-organismos. Portanto, sua otimização é de grande importância para a redução dos custos produtivos (Joo e Chang, 2005).

O uso de meios de cultura alternativos para produção de proteases por *Bacillus* tem sido relatado em muitos trabalhos científicos. Esses meios podem ser obtidos a partir de várias fontes tais como casca em pó de camarão e caranguejo (Yang *et al.*, 2000), farinha de peixe (Ellouz *et al.*, 2001), farelo de soja (Joo *et al.*, 2002; Joo e Chang, 2005), farinha de sementes de amaranto (Pastor *et al.*, 2001), penas de frango (Gessesse *et al.*, 2003), araruta (Kumar e Parrack, 2003), soro de queijo e água de maceração de milho (Ladeira *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2007; Nascimento e Martins, 2007).

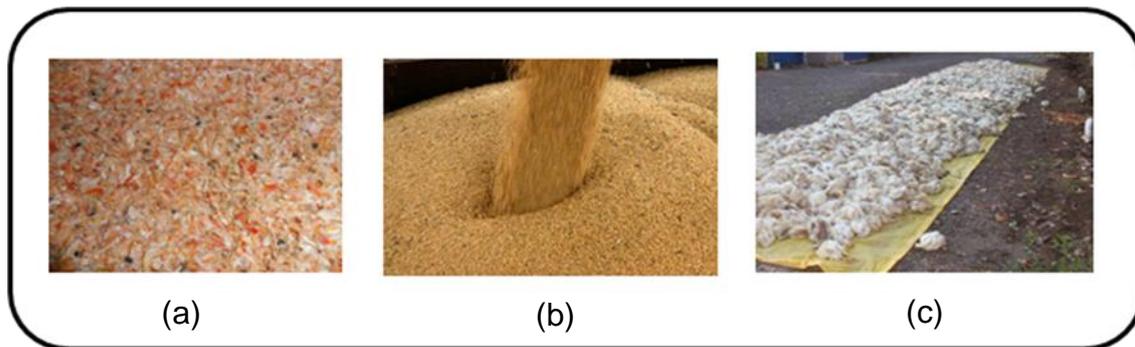


Figura 2: Exemplos de resíduos agroindustriais (a) farinha da casca de camarão; (b) farinha de soja; (c) penas de frango que são utilizados como suplementos de meio de crescimento microbiológico para produção de enzimas.

2.4. Separação e purificação de enzimas

Macromoléculas de uma forma geral e independente da fonte que as originam, podem ser extraídas e purificadas por métodos que sofrem adaptações dependendo do grau de separação e purificação desejados. O grau de purificação necessário de uma preparação enzimática vai depender de sua aplicação, assim produtos destinados a usos terapêuticos, por exemplo, são obviamente os que requerem maior grau de pureza e, portanto, a complexidade do processo de purificação é elevada. Para a utilização de enzimas em outros processos de biocatálise, desde que as impurezas presentes no extrato enzimático não interfiram na reação catalisada e na utilização do produto final, processos parciais de purificação podem ser suficientes (Said e Pietro, 2004).

As enzimas são purificadas pelo emprego sucessivo de métodos do fracionamento químicos ou físicos. O objetivo de cada etapa é reter o máximo possível da enzima que se quer purificar e eliminar, também o máximo possível, outras proteínas, ácidos nucleicos e outras substâncias. Uma das primeiras considerações a serem feitas quando se inicia um processo de recuperação e purificação de um metabólito celular é a sua localização, que pode ser extracelular, não necessitando de um processo de extração, intracelular ou ainda ligada à membrana. A maioria das proteases bacterianas é extracelular, embora exista um considerável número de proteases

intracelulares (Trevan *et al.*, 1990).

A primeira etapa de um processo de recuperação de proteases extracelulares é a separação da biomassa celular e das substâncias insolúveis do sobrenadante, que normalmente é efetuado através de processos de floculação, filtração, flotação ou centrifugação (Crueger e Crueger, 1993). Após este passo, normalmente se dispõe de um grande volume de extrato e por isso é conveniente adotar uma etapa que forneça sua concentração, que irá obter uma melhor adaptação às etapas subsequentes de purificação, que normalmente são limitadas a pequenos volumes de amostra. Alguns exemplos de procedimentos que poderiam ser adotados neste segundo passo do processo de purificação são: precipitação com sais, cromatografia de troca iônica ou precipitação isoelétrica (Beynon e Bond, 1996).

A precipitação pode ser do tipo positivo ou negativo, isto é, precipitação das impurezas ou da enzima respectivamente, embora a última seja preferida, pois a enzima precipitada pode ser ressuspensa em um pequeno volume de líquido, obtendo desta maneira a concentração. A precipitação utilizando sulfato de amônio é a mais comum, pois é um procedimento simples e barato que produz graus consideráveis de recuperação e purificação, além do fato de que altas concentrações deste sal podem aumentar consideravelmente a estabilidade de muitas enzimas (Trevan *et al.*, 1990).

As etapas subsequentes de um processo de purificação, normalmente são realizadas através de processos de cromatografia em coluna e consistem nas etapas mais caras do procedimento (Crueger e Crueger, 1993). Estes processos podem ser realizados através de diversos tipos de cromatografia, que irá separar as proteínas por diferentes gradientes (tabela 2). Muitas proteases podem e são purificadas com uma combinação destas etapas convencionais (Beynon e Bond, 1996).

Tabela 2: Classificação das técnicas de cromatografia líquida de acordo com a característica físico-química que é explorada das proteínas.

Tipo de Cromatografia	Característica da proteína	Condição Inicial da Amostra	Eluentes	Condição Final da Amostra	Custo
Gel Filtração	Volume molecular	Volume da amostra <5% do volume da coluna	Qualquer solução aquosa	Amostra diluída em eluente	+
Troca Iônica	Carga	Baixa concentração iônica	Soluções salinas ou com pHs distintos da condição inicial	Amostra concentrada em solução salina	++
Interação Hidrofóbica	Hidrofobicidade	Alta concentração de sal	Soluções com baixa concentração salina	Amostra concentrada em solução salina	++
Fase Reversa	Hidrofobicidade	Pode conter altas concentrações de sais	Solvente orgânico	Amostra sem sais em solventes voláteis	+++
Afinidade	Especificidade a ligantes	Condições específicas para ligação	Alta concentração de ligante ou sais	Amostra concentrada contendo ou não ligante	+++

Fonte: Almeida e Kurtenbach (2002).

3.0 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo principal a produção de proteases pela fermentação submersa do micro-organismo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 em meio de crescimento suplementado com resíduos agroindustriais de baixo custo. Bem como a parcial purificação da enzima com a finalidade de concentrá-la para futuros testes de sua aplicação em formulações de detergentes.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Micro-organismo e condições da cultura

O micro-organismo empregado 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-RJ, no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Segundo estes autores, os resultados da comparação das sequências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoolycticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1.

As culturas foram mantidas em estoques constituídos do cultivo em meio TSY [triptona 20 g.L⁻¹; NaCl 10 g.L⁻¹; extrato de levedura 10 g.L⁻¹ e água destilada] pH 7,5, contendo 20% de glicerol (v/v) e armazenado na temperatura de -20 °C.

4.2. Obtenção da enzima

4.2.1 Meio de crescimento

O meio de crescimento da bactéria foi constituído de ((g.L⁻¹), KCl, 0,3; K₂HPO₄, 0,87; CaCl₂, 0,29; MgSO₄, 0,5; proteínas do soro de leite, 1,0; água de maceração de milho, 3 mL.L⁻¹; amido solúvel, 2,5 e traços de metais, 1 mL.L⁻¹). Seu pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 2 M e, posteriormente esterilizado em autoclave a 121°C durante 15 min).

4.2.2. Preparo do pré-inóculo de *Bacillus* sp. SMIA-2

O pré-inóculo foi preparado a partir do micro-organismo armazenado a -20 °C estriando-o em placas de Petri contendo meio TSY (adicionado ágar-ágar 20 g.L⁻¹) . As placas foram incubadas em estufa (modelo Q 315 D26, QUIMIS) a 50°C por 18 horas. Após este período, 5 mL do meio de crescimento, descrito no item 4.2.1, foram transferidos para as placas afim de ressuspender as células, que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril.

Estas células foram transferidas para um frasco erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de crescimento (descrito no item 4.2.1), incubados por mais 18 horas a 50°C em agitador rotatório (Thermo Forma Orbital Shaker, Ohio, EUA) operando a 150 rpm.

4.2.3. Fermentação

O meio de crescimento (50 mL em erlenmeyer de 250 mL) foi inoculado com 1 mL do pré-inóculo e incubado em um agitador rotatório a 150 rpm em temperatura de 50°C por 36 horas.

Para a realização de uma curva de crescimento desta bactéria a fim de avaliar as fases de crescimento (medido em espectrofotômetro a 600nm), pH e atividade enzimática (descrito no item 4.3), foram retiradas alíquotas a cada 6 horas, externando o período da madrugada.

4.3 Determinação da atividade proteásica

A atividade proteásica foi verificada em todas as etapas pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15% (Johnvesly e Naik, 2001). O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão Tris/HCl 0,05 M (pH 8,5). Nesta análise, a solução enzimática foi adicionada ao substrato e incubado em banho-maria a 70°C por 10 minutos. A reação foi paralisada pela adição de TCA, centrifugada (Hermele Z 382K) a 15.000g por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante colocado em tubos de ensaio contendo uma solução de

NaOH 1 N. Paralelamente, foi feito um tubo branco que continha todos os reagentes do ensaio, exceto que o TCA foi adicionado antes do extrato enzimático. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorbância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

4.4 Determinação da concentração de proteínas solúveis

Para determinar o conteúdo de proteína solúvel das amostras utilizou-se o método descrito por Lowry et al. (1951) modificado por Peterson (1977), com o emprego de reagente de Folin-Ciocalteu. Trabalhou-se com dois reagentes: o reagente combinado (RC), preparado com 0,5 mL de 0,5% de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,5 mL de 1% de tartarato de Na/K e 2% de solução de Na_2CO_3 em 0,1 N de NaOH até o volume de 50 mL; e o reagente de Folin-Ciocalteu (FC). Para a reação misturou-se 40 μL de amostra e adicionou-se 2,0 mL de RC, deixou-se 15 minutos à temperatura ambiente. Adicionou-se 200 μL do reagente de FC e deixou-se à temperatura ambiente por mais 30 minutos. Às determinações de proteína solúvel de cada ponto foi medida a absorbância (750 nm) em espectrofotômetro Shimadzu modelo UVmini-1240. Paralelamente, foi preparado um controle com 40 μL de água destilada mais reagentes. A concentração de proteína foi determinada através de comparação com curva padrão preparada com albumina sérica bovina (Sigma).

4.5 Purificação da enzima

4.5.1 Precipitação com sulfato de amônio

Após o período de fermentação, a cultura foi centrifugada a 4.500g por 30 minutos. Ao sobrenadante livre de células foi adicionado $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (60% de saturação) e após 18 horas de repouso a 4°C foi novamente centrifugado a 15.000g por 15 minutos. Posteriormente, o precipitado, foi ressuspendido em tampão Fosfato 0,01 M (pH 7,5) e dialisado contra o mesmo tampão a 4°C por 18 horas. As amostras dialisadas foram secas através de liofilização (K105, Liotop) para concentração da mesma e para armazenamento sem que haja perda de atividade.

4.5.2 Cromatografia de afinidade

Para a purificação foi utilizada a técnica de cromatografia de afinidade, empregando-se uma resina de Benzamidina Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) que foi empacotada em uma coluna (20 x 2,5 cm), lavada primeiramente com água ultrapura e posteriormente equilibrada com tampão de ligação (Tris-HCl 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7,4). Após aplicação da amostra, o material foi lavado com o tampão de ligação (3 vezes o volume da coluna) para coletar substâncias que não tiveram interação com a resina. E utilizado o tampão de eluição (Glicina 0,05 M, pH 3,0) para fazer com que a amostra que interagiu com a resina se soltasse e fosse coletada. Pelo tampão de eluição ser muito ácido, a enzima perdia sua atividade, então logo após ser coletadas as amostras, foi adicionado 1 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 9,0, o que fazia a enzima retornar sua atividade com pouca perda da mesma. O padrão de eluição da proteína foi determinado pela medida da absorbância a 220 nm. Adicionalmente cada fração obtida (não retida e retida) foi dialisada em tampão Fosfato 0,01 M por 24 horas.

4.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As frações coletadas da cromatografia de afinidade foram monitoradas por eletroforese em gel de tricina segundo a metodologia descrita por Schägger e Von Jagow (1987) e segundo metodologia descrita por Laemmli (1970) em sistema de eletroforese Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad). Após cada etapa de purificação as amostras foram diluídas em tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5 %, azul de bromofenol 0,25 % e sacarose 15 %) e aplicadas em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras foram analisadas na ausência de β -mercaptoetanol, como descrito acima ou na presença de 0,5% de β -mercaptoetanol. A separação de proteínas foi realizada através da aplicação de campo elétrico (120 V e 400 mA), e a observação de bandas foi possível após coloração do gel com nitrato de prata.

4.5.4 Zimograma

As mesmas amostras também foram analisadas por zimografia, que foi desenvolvida em gel de poliacrilamida contendo SDS e copolimerizado com 0,5% (v/v) de gelatina (Merck). As amostras foram diluídas no tampão de amostra exceto a adição de agente redutor e desnaturação por calor e a corrida ocorreu refrigerada a 4°C. Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes com tampão Tris-HCl (0,05 M pH 8,0) contendo 2,5% de Triton X-100 por 40 minutos. Após, o gel foi incubado com Tris-HCl (0,05 M pH 8,0) contendo CaCl₂ 0,01 M e MgCl₂ 0,01 M a 70 °C durante 1 hora. Em seguida, o gel foi fixado com 50% de metanol contendo 10% de ácido acético e corado com Comassie Blue.

4.5.5 Determinação da classe de proteases

Foram utilizados quatro inibidores de classes de proteases, PMFS (serino), EDTA (metalo), pepstatina (aspártico) e iodoacetamida (cisteína) em concentrações de 2 mM, 25 mM, 0,1 mM e 0,1 mM, respectivamente para analisar quais classes de proteases estavam presentes nas amostras eluídas da etapa 3.2.5. Todas as soluções de inibidores foram incubadas com as amostras por 60 minutos em temperatura ambiente e posteriormente feita a determinação da atividade proteásica.

4.5.6 Cromatografia de fase reversa

A fração retida obtida a partir da cromatografia de afinidade foi aplicada em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), (Promenence, Shimadzu) utilizando coluna de fase reversa C18 (Shim-pak VP-ODS, 250 x 4,6 mm, Shimadzu) acoplada a uma coluna guarda C8 (Pelliguard, 20 x 4,6 mm, Sigma). Após aplicação da amostra, a coluna foi lavada com Solvente A (TFA 0,1% e água ultrapura) por 5 minutos, nos 78 minutos seguintes houve um gradiente de 0 – 50% de Solvente B (2-propanol 100% e TFA 0,1%). Nos 6 minutos restantes o gradiente de solvente B voltou a 0%. Todos os picos revelados foram coletados, liofilizados e posteriormente analisados.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perfil do crescimento e atividade da protease secretada pelo *Bacillus* sp. SMIA-2

O perfil do crescimento microbiano, do pH do meio e da atividade da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultivo contendo amido solúvel, proteínas do soro de leite e água de maceração de milho é mostrado na Figura 3.

A atividade da protease, em 6 horas de fermentação, era de 12,67 U/mg de proteína. Atingiu seu máximo (27,94 U/mg proteína) em 36 horas e, a partir daí, decresceu. Portanto, o período de 36 horas foi definido como o melhor tempo de incubação da cultura para a obtenção de amostras (proteases) para serem usadas nos processos de semipurificação e demais testes de aplicação da enzima.

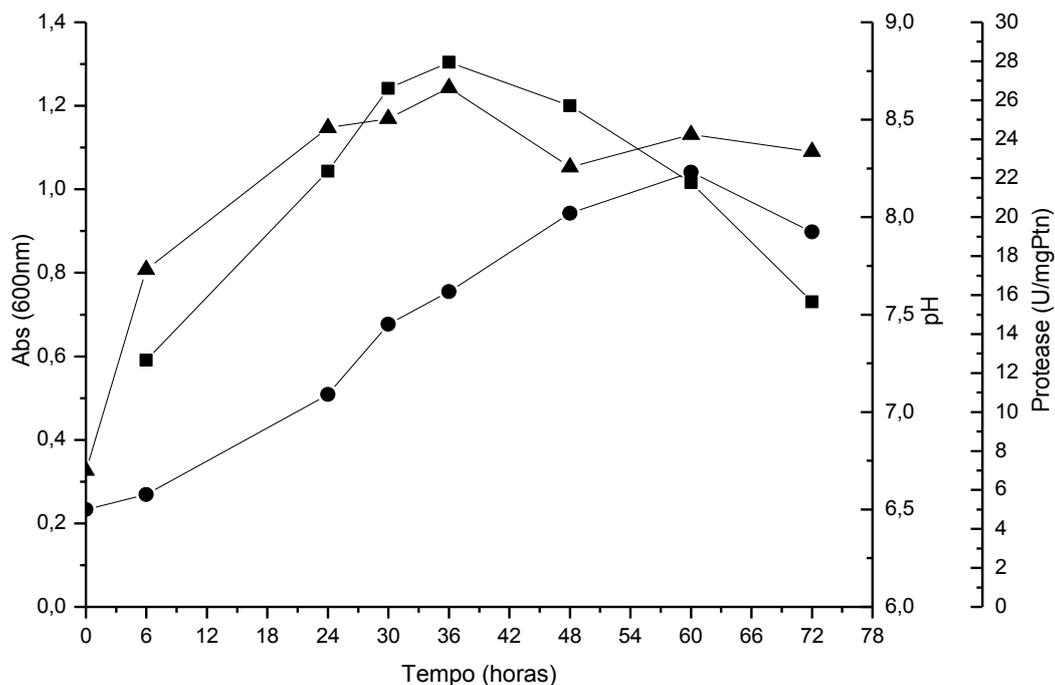


Figura 3: Visualização gráfica mostrando o crescimento (\blacktriangle), pH (\bullet) e a atividade da protease (\blacksquare) secretada pelo *Bacillus* sp SMIA-2 cultivado em meio líquido contendo $2,5 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ amido solúvel, $1,0 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ proteínas do soro de leite e $3,0 \text{ (g.L}^{-1}\text{)}$ água de maceração de milho a 50°C e 150 rpm , ao longo de 72h .

Os resultados do perfil do crescimento do micro-organismo e a atividade da protease em função do tempo de fermentação sugerem que a indução efetiva desta enzima não ocorre até que a fase estacionária seja alcançada e corroboram com os achados por Gupta *et al.* (2002), que relataram que espécies de *Bacillus* produzem proteases extracelulares durante o final da fase logarítmica e início da fase estacionária. A produção máxima de proteases em *Bacillus subtilis* correspondeu com o ponto máximo de esporulação do micro-organismo e que a síntese de proteases em espécies de *Bacillus* é necessária para que o processo de esporulação ocorra (Mukhtar e Haq, 2012).

Ainda de acordo com a Fig.3, o pH do meio aumentou gradativamente, atingindo o valor de $8,0$ em 48 horas, indicando que compostos orgânicos de nitrogênio tais como aminoácidos e peptídeos, foram consumidos (Silva et al. 2007).

5.2. Purificação parcial da protease secretada por *Bacillus* sp SMIA-2

5.2.1 Precipitação com Sulfato de Amônio

O processo de pré-purificação das proteases secretadas por *Bacillus* sp SMIA-2 consistiu de 2 etapas: precipitação do extrato bruto (sobrenadante da cultura livre de células) com sulfato de amônio seguida da diálise. O resumo do processo de purificação parcial está apresentado na tabela 3. Ao final deste processo a amostra foi chamada de fração 0-60 (F₀₋₆₀).

Tabela 3: Quadro de purificação parcial da protease extracelular produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2

	Atividade Total (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Atividade Específica (U/mgPtn)
Extrato Fermentado	13,88	0,497	27,93
Precipitado	26,34	0,574	45,89
Dialisado	73,68	0,287	256,72

A atividade da protease no extrato bruto após a precipitação com sulfato de amônio seguida da diálise obteve um aumento considerável quando comparada à atividade dessas enzimas no extrato bruto. Este aumento era esperado, uma vez que estes processos têm a finalidade de remover contaminantes não proteicos e a remoção de proteínas que não sejam de interesse de forma a se obter o máximo de atividade específica e da atividade inicial (Fedatto, 2004). Portanto, como primeiro passo da etapa de purificação, a precipitação fracionada foi eficiente além de rápida. Para fins comerciais a enzima não necessita de uma pureza absoluta, por isso essas etapas podem ser empregadas com sucesso.

5.2.2. Cromatografia de Afinidade

A amostra resultante da etapa de pré-purificação (F₀₋₆₀) foi liofilizada para ser estocada seca, diminuindo assim a perda de atividade enzimática. Uma fração de 0,04 g da amostra liofilizada foi ressuspensa em 2 mL de 50

mM Tris-HCl, pH 7,4 e aplicada em uma coluna de cromatografia de afinidade (Benzamidina Sepharose, GE). O tampão de ligação utilizado faz com que as enzimas que possuem afinidade com a resina, se liguem a ela e por outro lado, faz eluir as substâncias que não possuem afinidade à benzamidina. Além disso, um outro tampão de eluição, 500mM Glicina, pH 3,0 foi utilizado para fazer com que as enzimas que estivessem ligadas à resina desacoplar e serem eluídas. A figura 4 apresenta o perfil da F₀₋₆₀ na cromatografia de afinidade. Um total de 36 tubos de 2 mL cada foram coletados e aqueles que apresentaram um pico de absorvância a 220 nm foram submetidos à análise da atividade enzimática. No cromatograma pode ser observado um pico na fração não-retida e um outro pico na fração retida.

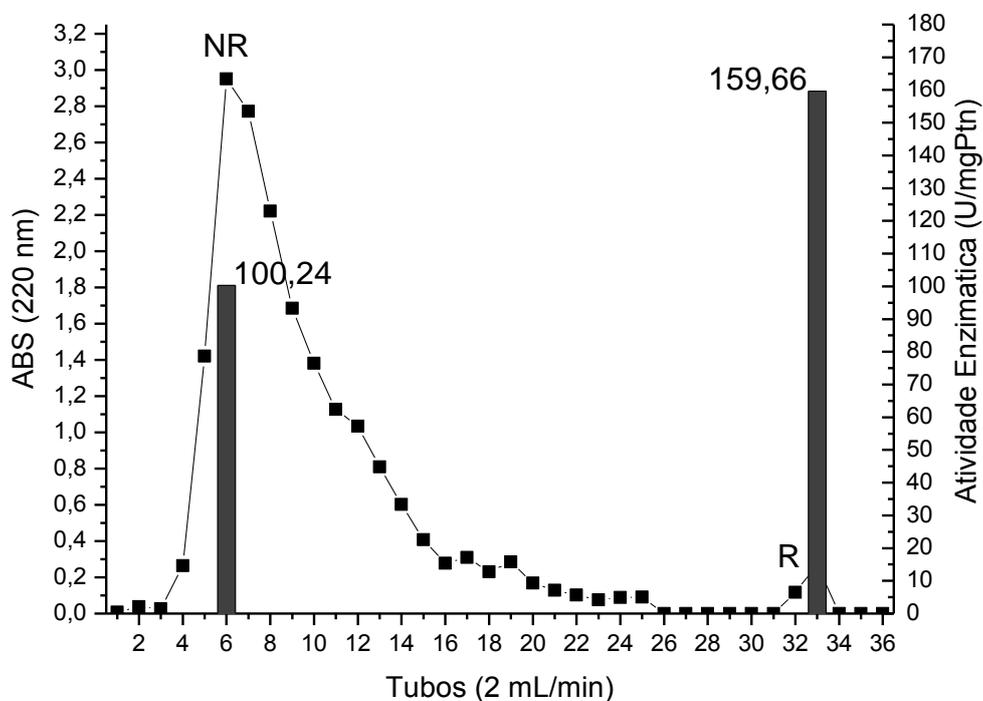


Figura 4: Cromatograma da F₀₋₆₀ em coluna de cromatografia de afinidade com resina de Benzamidina Sepharose. Absorbância a 220 nm (■) e atividade proteásica (U/mgPtn). NR, pico não retido eluído com tampão Tris-HCl e R, pico retido eluído com tampão Glicina.

As amostras dos tubos que apresentaram os picos foram coletadas, dialisadas, concentradas por liofilização e posteriormente utilizadas para a dosagem da atividade proteásica e da proteína. Em ambas as frações foi encontrada atividade enzimática, sendo a fração não-retida um pouco mais

baixa (100,24 U/mg proteína) que a fração retida (159,66 U/mg proteína). A resina utilizada possui afinidade com serino-proteases, indicando que outras classes de proteases existentes na amostra não se ligaram à resina, sendo eluídas na fração não-retida. A classe que ligou à resina foi eluída apenas quando utilizado o tampão de eluição.

5.2.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Os géis de eletroforese da amostra F₀₋₆₀ e dos picos coletados da coluna de benzamidina estão mostrados na Fig.5. Foram aplicados nos poços do gel, tanto amostras do extrato bruto, do pico não-retido como do pico retido na coluna de afinidade. Além disso, em cada uma das amostras foi adicionado o tampão de amostra com o agente β -mercaptoetanol que foram posteriormente aquecidas a 100°C por 10 minutos.

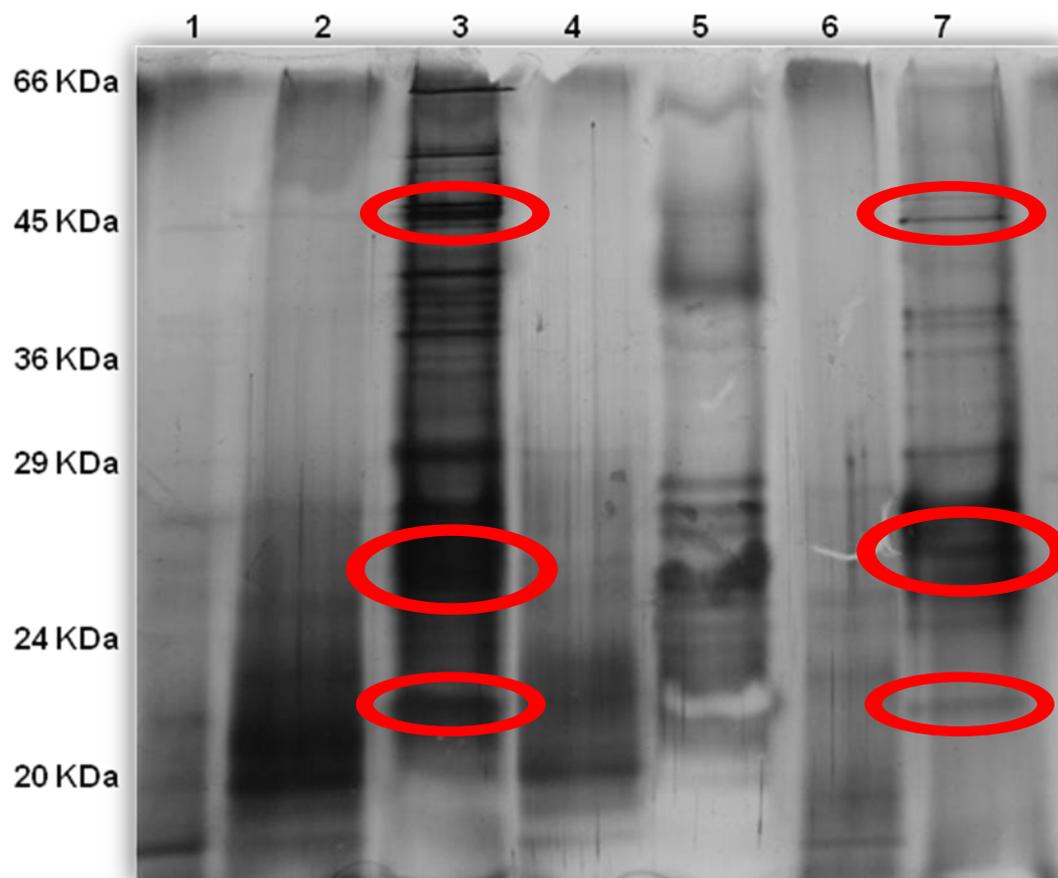


Figura 5: Visualização eletroforética em gel SDS-PAGE de amostras das diferentes etapas de purificação de protease do *Bacillus* sp SMIA-2. Poço 1-

marcador alto peso molecular. Poço 2- F₀₋₆₀ com β -mercaptoetanol. Poço 3- F₀₋₆₀ sem β -mercaptoetanol. Poço 4- NR com β -mercaptoetanol. Poço 5- NR sem β -mercaptoetanol. Poço 6- R com β -mercaptoetanol. Poço 7- R sem β -mercaptoetanol. Gel corado com prata.

Nas amostras sem a presença do β -mercapetanol foi observado uma maior quantidade de bandas proteicas mais fortes. O β -mercaptoetanol é utilizado como redutor de pontes de dissulfeto em ensaios de eletroforese de proteínas. Este composto ao quebrar estas ligações faz com que as proteínas se decomponham em suas subunidades menores, não sendo reveladas no gel. Portanto, através da realização deste gel foi possível demonstrar a diminuição de proteínas do extrato bruto na fração retida da cromatografia de afinidade.

Ainda através da Fig.5, foi possível verificar a existência de proteínas de pesos moleculares distintos em todas as amostras, mais especificamente proteínas de tamanhos variando de 45 kDa a 24 kDa. Geralmente o peso molecular de proteases oriundas de espécies de *Bacillus* está entre 15 e 40 kDa, mas há relatos de proteases alcalinas de *Bacillus* que possuem peso molecular entre 48 a 62 kDa (Kazan et al., 2005).

5.2.4. Zimograma

A fim de avaliar quais bandas reveladas no SDS-PAGE possuem atividade proteásica foi feito um zimograma contendo gelatina. Todas as amostras não continham o agente redutor β -mercaptoetanol.

De acordo com o resultado mostrado na Fig. 6, pode-se observar bandas fortes correspondendo a atividade proteolítica nas três amostras no topo do gel (aproximadamente 65 kDa), e outras duas bandas aproximadamente de 29 e 24 KDa que foram reveladas tanto no extrato semipurificado, que não passaram pela cromatografia, quanto na fração retida da coluna, respectivamente. Provavelmente, as possíveis enzimas possuem características diferentes e a atividade proteolítica não ocorreu devido a uma única proteína.

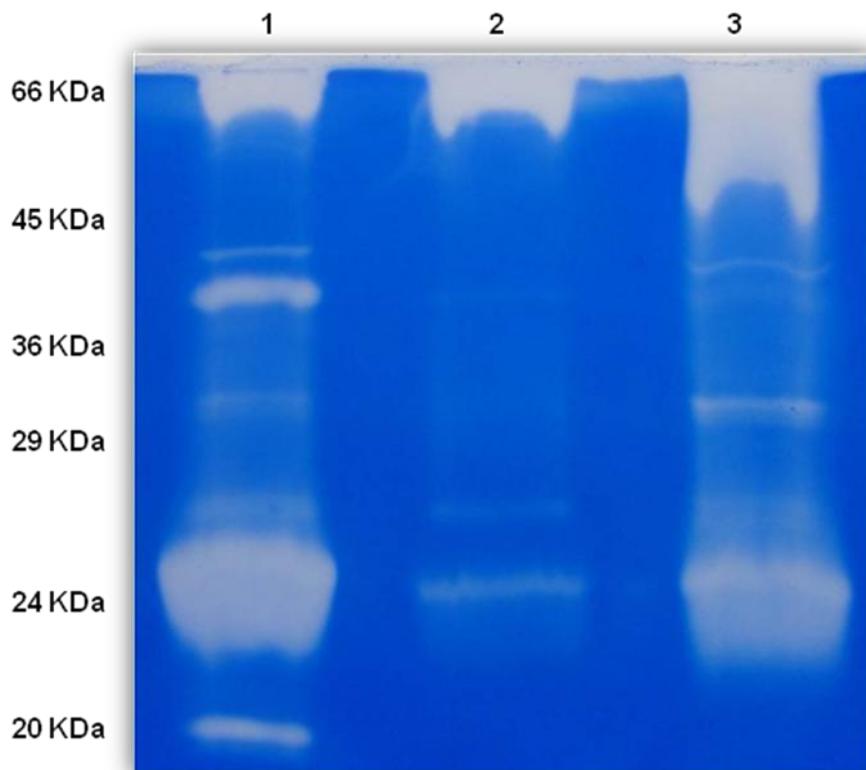


Figura 6: Zimograma. Poço 1- Extrato semipurificado; Poço 2- Fração não retida e poço 3- Fração retida.

5.2.5. Efeito de inibidores de protease na atividade enzimática

Um teste com inibidores de proteases foi realizado para verificar quais classes estavam presentes em cada fração. Os inibidores testados foram o Etilenodiaminotetracetato (EDTA), inibidor para metaloprotease; iodoacetamida, inibidor para cisteíno proteases; pesptatina, inibidor de ácido aspártico proteinases e fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMFS), inibidor para serino protease. A comparação foi feita com um controle, que foi a enzima incubada com tampão na mesma proporção que as soluções dos inibidores.

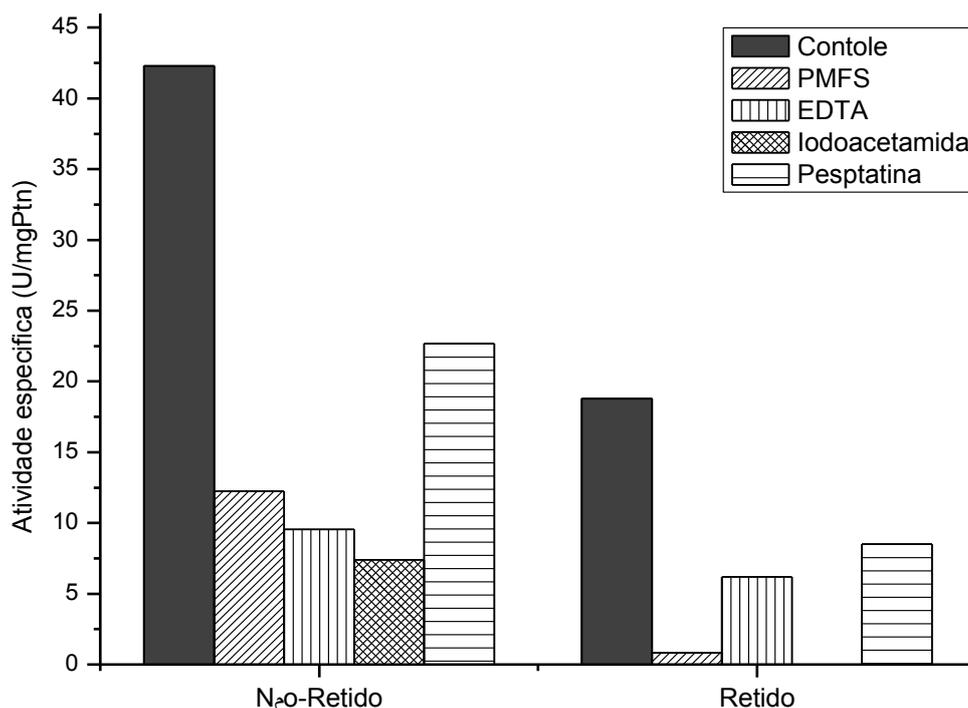


Figura 7: Visualização gráfica do teste com inibidores de classes de proteases tanto na fração Não-Retida quanto na fração Retida da cromatografia de Afinidade.

De acordo com os resultados apresentados na Fig. 7, a iodoacetamida e o PMFS inibiram drasticamente a enzima presente na fração retida (100% e 95% de inibição) no pico Retido, sugerindo que as proteases extracelulares de *Bacillus* sp SMIA-2 podem pertencer tanto à classe das cisteínas como das serino proteases. Os outros inibidores testados, embora em menor intensidade, promoveram uma redução na atividade das proteases tanto na fração retida quanto na fração não retida, o que mostrou a existência das quatro classes de proteases nas amostras fermentadas pelo micro-organismo termofílico utilizado.

5.2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Considerando que a fração retida da cromatografia de afinidade foi a de maior interesse no trabalho, uma vez que apresentou uma protease serínica, ela foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência utilizando uma

coluna de fase reversa (C18), com um gradiente de propanol de 50%. O perfil de eluição é mostrado na Fig. 8.

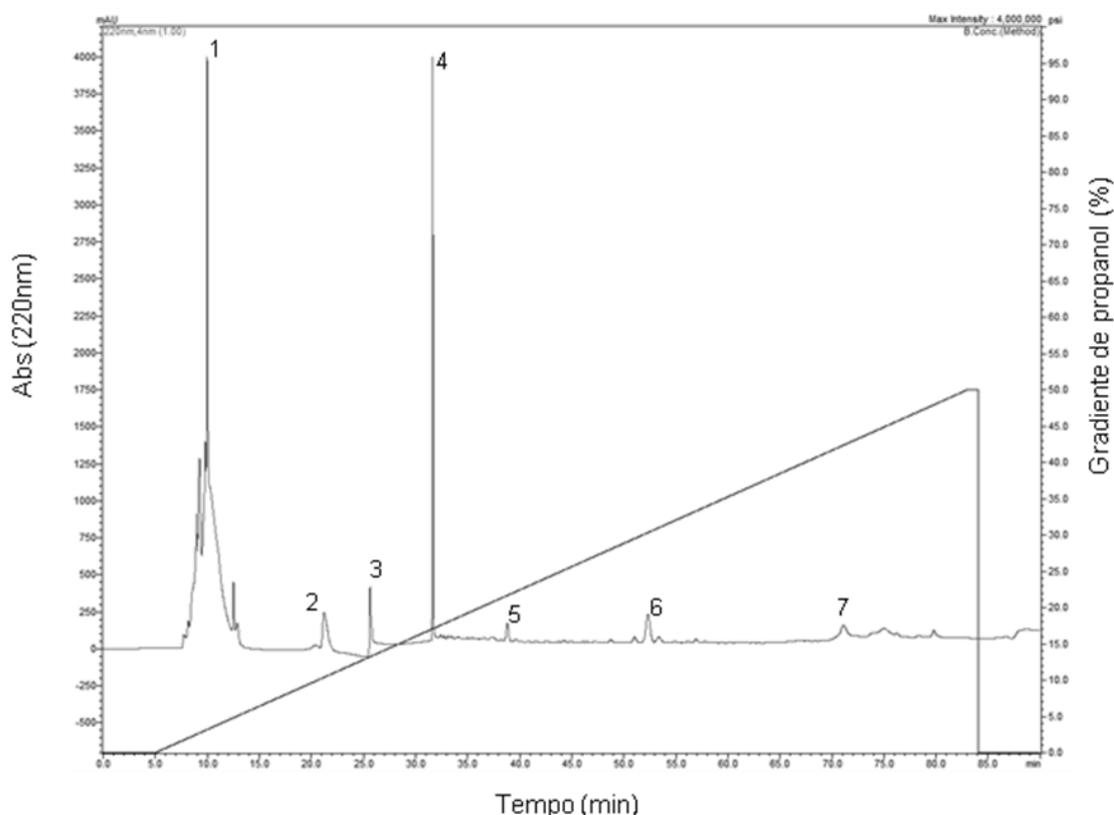


Figura 8: Cromatografia do pico R da coluna de afinidade em coluna de fase reversa C18. Foram coletados 7 picos retidos e eluídos em gradiente de propanol.

De acordo com o cromatograma mostrado na Fig. 8 pode-se observar que a partir dos 5 minutos de corrida os picos começaram a ser visualizados (220 nm), e então foram coletados separadamente. Ao final da corrida, foram coletados sete picos individuais, e também os vales entre os picos, que foram liofilizados para dosagem da atividade enzimática e quantificação da proteína na amostra (Tab. 4). Em todos os vales e nos dois primeiros picos não foi encontrada nenhuma atividade proteásica, enquanto nos outros picos (3,4,5,6 e 7) foram detectadas atividades de proteases. Ressalta-se que o pico 6 foi o que chamou maior atenção, devido à sua atividade proteolítica extremamente alta (116,4 U/mL) com uma baixa quantidade de proteína (0,095 mg/mL).

Tabela 4: Atividade proteásica dos picos do CLAE

Picos	U/mL	Ptn	U/mgPtn
1	0	0,848	0,00
2	0	0,000	0,00
3	33,6	0,290	115,93
4	37,8	0,396	95,36
5	48	0,085	564,71
6	116,4	0,095	1225,26
7	24	0,177	135,68

Dessa maneira, o pico 6 levou a uma fração de protease significativamente pura, levando em consideração a diminuição da proteína, sem perda da atividade proteásica. A atividade aumentou quando comparada a todas as etapas em que essa amostra foi submetida. Portanto, as etapas usadas neste trabalho para a purificação da enzima de interesse resultaram em uma fração enriquecida de protease.

5.3. Rendimento da purificação

Os passos utilizados para a purificação da protease, mostrando o rendimento e o fator de purificação que foi encontrado nas amostras de cada etapa estão apresentados na Tab. 5.

Tabela 5: Resumo das etapas de purificação de protease de *Bacillus* sp SMIA-2

Etapas de Purificação	Volume Total (mL)	Atividade Total (U)	Proteína (mg)	Atividade Específica (U/mgPtn)	FP
Extrato Fermentado	2500	34700	1242,5	27,93	1
Precipitado + Dialisado	185	13630,8	53,095	256,72	9,19
Cromatografia de Afinidade	12	645,12	4,040	159,68	5,72
HPLC - pico 6	0,5	58,2	0,047	1238,30	44,34

FP: Fator de Purificação

De acordo com os resultados encontrados foi possível purificar parcialmente a enzima, com uma pureza de 44 vezes. Outros investigadores também relataram o isolamento de proteases com pesos moleculares baixos a partir de isolados de *Bacillus*, adotando métodos diferentes de purificação.

Gessesse et al. (2013) purificaram uma protease alcalina de *Bacillus pseudofirmus* AL-8924 obtendo uma pureza de 22,6 vezes. Adinarayana et al. (2013) purificaram uma protease alcalina de 15 kDa a partir de *B. subtilis* PE-11 e uma protease alcalina de 28 kDa foi purificada a partir de *Bacillus clausii* I-52 por Joo e Chang (2005a). Além disso, Gupta et al. (2005) purificaram uma protease alcalina a partir de *B. pseudofirmus* de pureza de 10 vezes. Finalmente, Sareen e Mishra (2008) purificaram uma protease alcalina de 55 kDa a partir de *Bacillus licheniformis* PSR-09-37 que resultou uma purificação de 85 vezes.

6.0 CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados neste trabalho pode-se concluir que:

- A cepa *Bacillus* sp SMIA-2 utilizada neste estudo é capaz de crescer e utilizar os resíduos agroindustriais adicionados ao meio de cultura como fonte de energia, produzindo proteases e excretando-as para o meio extracelular;
- A melhor condição de fermentação para produção de proteases é de 36 horas, a 50°C em rotação orbital de 150 rpm;
- O processo adotado como pré-purificação da enzima de interesse, precipitação com sulfato de amônio e posterior diálise, já é amplamente utilizado e mostrou alta eficiência na limpeza de substâncias indesejáveis na amostra;
- Com os métodos adotados para alcançar um grau de pureza maior da enzima, obteve sucesso com a cromatografia de afinidade seguida de cromatografia de fase reversa em HPLC;
- Ao final da purificação parcial da protease reduziu a concentração de proteína em mais de 5 vezes, obtendo um fator de purificação de quase 50 vezes.

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adinarayana, K., Ellaiah, P., Prasad, D.S. (2003) Purification and partial characterization of thermostable serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus subtilis* PE-1. *AAPS Pharmacol. Sci. Technol.* 4: 56-61
- Almeida, M. S., Kurtenbach, E. (2002) Como purificar proteínas. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento.* 24: 30-35.
- Andrade, C.M.M.C., Pereira JR., N., Antanikian, G. (1999) Extremely Thermophilic Microorganisms and their polymer-hydrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Aquino, A.C.M.H. (2000) Purificação e determinação de propriedades bioquímicas das atividades da glucoamilase e α -amilase produzidas pelo fungo termofílico *Scytalidium thermophilum*. Tese (Mestrado em Biologia comparada) – Ribeirão Preto – SP, Universidade de São Paulo – USP, 121p.
- Atomi, H. (2005) Recent progress towards the application of hyperthermophiles and their enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology.* 9: 166-173.
- Banerjee, U. C., Sani, R.K., Azmi, W., Soni, R. (1999) Thermostable alkaline protease from *Bacillus brevis* and its characterization as a laundry detergent additive. *Process Biochemistry*, 35: 213-219.

- Beg, Q.K., Saxena, R. K., Gupta, R. (2002) De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. *Process Biochemistry*, 78: 289-295.
- Beynon, R.J. e Bond, J.S. (1996) *Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* . New York: Oxford University Press, 1996, 257p.
- Bocchini, D. A., Oliveira, O.M.M.F., Gomes, E., Da Silva, R. (2005) Use of sugarcane bagasse and grass hydrolysates as carbon sources for xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation. *Process Biochemistry*, 40: 3653-3659.
- Bourgaize, D., Jewell, T.R., Buiser, R.G. (2000) *Biotechnology: Demystifying the Concepts*. Benjamin/Cummings, San Francisco.
- Caldas, C., Cherqui, A., Pereira, A. e Simões, N. (2001) Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immune suppression. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1297-1304.
- Carvalho, R.V., Corrêa, T.L.R., Silva, J.C.M., Mansur, L.R.C.O., Martins, M.L.L. (2008) Properties of an amylase from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 102-107.
- Chantawannakul, P., Oncharoena, A., Klanbuta, K., Chukeatiroteb, E., Lumyonga, S. (2002) Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soy bean in Northern Thailand. *Science Asia*, 28: 241-245.
- Corrêa, T.L.R., Moutinho, S.K.S., Martins, M.L.L., Martins, M.A. (2011) Simultaneous amylase and protease production by the soil bacterium *Bacillus* sp. SMIA-2 under submerged culture using whey protein concentrate and corn steep liquor: Compatibility of enzymes with commercial detergents. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 31:34-40.

- Crueger, W. e Crueger, A. (1993) *Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial*. Zaragoza: Acribia, 413 p.
- Demajorivic, J. (1995) Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades. *Revista de Adm. De Empresas*. 35: 88-93.
- Deycier, E., Guilet, R., Sarda, S., Sharrock, P. (2005) Physical and chemical characterization of crudemeat and bonemeal combustion residue: “waste or raw material?”. *Journal Hazard Materials*, 121: 141-148.
- Do Canto, W.L., Menezes, T.J.B. (1995) *Estudos Econômicos – Alimentos Processados: Produção, usos e mercado de enzimas*. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL.
- Egorova K., Antranikian, G. (2005) Industrial relevance of thermophilic Archaea. *Current Opinion in Microbiology*, 8: 649-655.
- Ellouz, Y., Bayoudh, S., Kammoun, N., Gharsallah, N., Nasri, M. (2001) Production of protease by *Bacillus substilis* grown on sardinelle heads and visceraflour. *Biores. Technol*, 80: 49-51.
- Ereno, D. (2005) *Revista Pesquisa FAPESP*. Disponível em: www.revistapesquisa.fapesp.br. Acessado em fevereiro de 2014.
- Fedatto, L. M. (2004) Caracterização de proteases extracelulares produzidas por *Xylella fastidiosa* de citros e videira. Piracicaba. Dissertação - (Mestrado), Universidade de São Paulo, Curso Interunidades, ESALQ/CENA-USP.
- Ferrer, J. Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., Ferrer, A. (2001) Agronomic use of biotechnological y processed grape wastes. *Bioresource Technology*, 76: 39-44.
- Ferrer, M., Golyshina, O., Beloqui, A., Golyshin, P.N. (2007) Mining enzymes from extreme environments. *Current Opinion in Microbiology*, 10: 207-214.

- Fields, P.A. (2001) Review: Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comparative Biochemistry and physiology*, 129:417-431.
- Gacesa, P.; Hublle, J. (1990) *Tecnología de las Enzimas*. 3ª edição, Editora Acribia. Zaragoza.
- Gessesse, A., Hatti-Kaul, R., Gashe, B.A., Mattiasson, B. (2003) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microbial Technol*, 32: 519–524.
- Gessesse, A. (1997) The use of nugmeal as a low-cost substrate for the production of alkaline protease by the alkaliphilic *Bacillus* sp. AR-009 and some properties of the enzyme. *Bioresource Technology*, 62:59–61.
- Gomes, E., Guez, M.A.U., Martin, N., Silva, R. (2007) Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. *Revista Química Nova*, 30:136-145.
- Gordon, R.E., Haynes, W.C., Pang, C.H.N. (1973) *The genus Bacillus*. United States Department of Agriculture. Washington.
- Grassmann, W. e Dyckerhoff, H. (1928). *Z. physiol. Chem.* 175, 18.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K., Gupta, M.N. (2005) One-step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkaliphilic *Bacillus* sp. *Journal of Chromatography A*, 1075: 103-108
- Gupta, R., Beg, Q., Lorenz, P. (2005) Bacterial alkaline proteases: Molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59: 15-32
- Gupta, R., Beg, Q.K., Khan, S., Chauhan, B. (2002). An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 381-395.

- Haki, G.D., Rakshit, S.K. (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, 89:17-34.
- Haruta, S., Nakayama, T., Nakamura, K., Hemmi, H., Ishii, M., Igarashi, Y., Nichino, T. (2005) Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91: 1–11.
- Hernández, M.S., Rodríguez, M.R., Gerra, N.P., Rosés, R.P. (2006) Amylase production by *Aspergillus niger* in submerged cultivation on two wastes from food industries. *Journal of Food Engineering*, 73: 93-100.
- Hough, D. W., Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*, 3: 39-46.
- Jaenicke, R., Bohm, G. (1998) The stability of Proteins in Extreme Environments. *Currents Opinion in Structural Biology*, 8: 738-748.
- Johnvesly, B., Naik, G.R. (2001). Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium. *Process Biochemistry*, 37: 139 -144.
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005a) Oxidant and SDS-stable alkaline protease from a halo-tolerant *Bacillus clausii* I-52: enhanced production and simple purification. *Journal of Applied Microbiology*, 98: 491- 497
- Joo, H.S., Chang, C.S. (2005b) Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*, 40:1263 -1270.
- Joo, H., Kumar, C.G., Park, G., Kim, K.T., Paik, S.R., Chang, C. (2002) Optimization of the production of an extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*, 38: 155 -159.
- Kalisz H.M. (1988) Microbial proteinases. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, 36: 1-65.

- Kumar, C.G., Parrack, P. (2003) Arrowroot (*Maranthaa rundinacea*) starch as a new low-cost substrate for alkaline protease production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19: 757-762.
- Kumar, C.G., Takagi, H. (1999) Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial view point. *Biotechnology Advances*, 17:561-594.
- Ladeira, S.A., Andrade, M.V.V., Delatorre, A.B., Perez, V. H., Martins, M.L.L. (2010). Utilização de resíduos agroindustriais para a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp em fermentação submersa: otimização do meio de cultura usando a técnica de planejamento experimental. *Química Nova*, 33: 324-328.
- Ladeira, S. A., Delatorre, A.B., Andrade, M.V.V., Martins, M.L.L. (2012) Utilization of pectin, cheese whey protein and corn steep liquor as an inexpensive medium for production of protease by thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian journal of food technology*, 15: 1-7.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lowry, O.H., Nira, J., Rosebrough, A., Farr, L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Madigan, M.T., Oren, A. (1999) Thermophilic and halophilic extremophiles. *Current Opinion in Microbiology*, 2: 265 -269.
- Mussatto, S.I., Fernandes, M., Milagres, A.M.F. (2007) Enzimas: poderosa ferramentas na industria. *Ciência Hoje*, 41: 28-33.
- Nascimento, W.C.A., Carvalho, R.V., Silva, C.R., Martins, M.L.L. (2007) Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus* sp termofílico. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27:417-421.

- Nascimento, W.C.A., Martins, M.L.L. (2004) Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35: 91- 96.
- Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., Antranikian, G. (1999) Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology Biotechnology*, 51: 711-29.
- Ng, T.k., Kennealy, W.R., (1986) Industrial applications of thermostable enzymes. In: Brock, T.D. (Ed.), *Thermophiles General. Molecular and Applied Microbiology*, 197-205
- Nunes, A.S., Martins, M.L.L. (2001) Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic *Bacillus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 271-275.
- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C. (2005) Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry and Molecular Biology*, 140: 369-380.
- Oskouie, S.F.G., Tabandeh, F., Yakhchali, B., Eftekhari, F. (2008) Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*. *Biochem. Eng. J.* 39: 37 - 42.
- Paik, H.D, Bae, S.S., Park, S.H., Pan, J.G. (1997) Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp *tochigiensis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 19: 294-298.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vandenberghe, L.P.S., Mohan, R. (2000) Technological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresour. Technology*, 74:81-87.
- Pandey, A., Selvakumar, P., Soccol, C.R., Nigam, P. (1999) Solid-state fermentation for the production of industrial enzymes. *Curr. Sci*, 77: 149-162.

- Pandey, A.; Soccol, C.R. (1998) Bioconversion of biomass: a case study of lignocellulosics bioconversions in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 41: 379–390.
- Pastor, M.D., Lorda, G.S., Balatti, A. (2001) Protease obtention using *Bacillus subtilis*3411 and amaranth seed meal medium at different aeration rates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32: 6-9.
- Peterson, G. L. (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346-356.
- Phadatares, S.U., Deshpande, V.V., Srinivasan, M.C. (1993) High activity alkaline protease from *Conidiobolus toronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatability with commercial detergents. *Enzyme and Microbial Technology*, 15: 72-76.
- Priest, F.G. (1977) Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev*, 41: 711-753.
- Rao, M.B., Tanksale, A. M., Ghatge, M.S., Deshpande, V.V. (1998) Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 597-635.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y., Yun, J., Ryu, H. (2008) Otimization of alkaline protease production by bacth culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches. *Bioresource Technology*, 99: 2242-2258.
- Romero, F.J., Garcia, L.A., Salas, J.A., Díaz, M., Quirós, L.M. (2001) Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratiamar cessens* grow in whey. *Process Biochemistry*, 36 :507-515.
- Rodrigues, P. M. (2012) Estabilidade de amilases e proteases produzidas simultaneamente por *Bacillus* sp SMIA-2 e compatibilidade das enzimas com componentes de formulações de detergentes. Tese (Mestrado Produção

Vegetal), Campos, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 75p.

Said, S., Pietro, R.C.L.R. (2004) Enzimas como agentes biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa, cap.6, p.94

Santos, G.R.R.M. (2007) Estudos funcionais de uma possível cisteína protease de *Xanthomona saxonopodispv. citri*. Tese (Mestrado em Biotecnologia) São Carlos – SP, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 77 p.

Sareen, R., Mishra, P. (2008) Purification and characterization of organic solvent stable protease from *Bacillus licheniformis* RSP-09-37. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 79: 399–405.

Secades, P., Guijarro, J.A. (1999) Purification and characterization of an extracelular protease from the fish pathogen *Yersinia ruckery* and Effect of culture conditions on production. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3969-3979.

Seki, T., Oshima, I. (1989) Taxonomic position of *B. subtilis*. In: Maruo B., Yoshikawa H. (eds) *Bacillus subtilis: molecular biology and industrial applications*. Elsevier, 7-21.

Sena, R.F. e Nunes, M.L. (2006) Utilization of agro-industrial wastes in the processing of feeds for carciniculture. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 7: 94-1026.

Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001) By-products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments. *Trends in Food Science & Technology*, 12: 401-413.

Schallmeyer, M., Singh, A., Ward, P.O. (2004) Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*, 50: 1-17.

Shiraki, K., Nishikori, S., Fujiwara, S., Hashimoto, H., Kai, Y., Takagi, M., Imanaka, T. (2001) Comparative analyses of the conformational stability of

a hyperthermophilic protein and its mesophilic counter part. *Eur. J. Biochemistry*, 268: 4144–4150.

Silva, C.R., Delatorre, A.B., Martins, M.L.L. (2007) Effect of the culture conditions on the production of an extracellular protease by thermophilic *Bacillus* sp and some properties of the enzymatic activity. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 253-258.

Singer, G.A., Hickey, D.A. (2003) Thermophilic prokaryotes have characteristic patterns of codon usage, amino acid composition and nucleotide content. *Gene*, 317: 39-47.

Singh, J., Batra, N., Sobti, C.R. (2000) Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Process Biochemistry*, 36: 781-785.

Sneat, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., Holt, J.G. (Eds.) (1986) Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 Williams & Wilkins, Baltimore.

Stetter, K.O. (1999) Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 452: 22-25.

Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H., Watanabe, K. (2006) Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102: 73–81.

Tan, Y. H., Ahab, M. N. (1997) Extracellular enzyme production during anamorphic growth in the edible mushroom, *Pleurotussajor-caju*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 13: 613-617.

Tavares, V. B., Sivieri, K., Ceron, C.R., Silva, R., Trabuco, E., Lombardi, F. R., Gomes, E. (1998) Utilização do Resíduo Líquido de Indústria de Processamento de Suco de Laranja Como Meio de Cultura de *Penicillium citrinum*: Depuração Biológica do Resíduo e Produção de Enzima. *Revista Química Nova*, 21: 722-725.

Trevan, M.D., Boffey, S., Go Uldinh, K.H. e Stanbury, P. (1990) Biotecnología: Principios biológicos. Zaragoza: Acribia, 284p

- Uenojo, M., Pastore, G.M. (2006) Isolamento e seleção de micro-organismos pectinolíticos a partir de resíduos provenientes de agroindústrias para produção de aromas frutais. *Ciê. Tecnol. Aliment*, 26: 509-515.
- Ward, O.P. (1985) Proteolytic enzymes. In: M. Moo-Young Editor, *Comprehensive Biotechnol*, 3: 789-818.
- Wiseman, A. (1985). *Manual de Biotecnologia de los enzimas*. Ed. Acribia, Zaragoza, Espanha.
- Yang, X. et al. (2001) Bioconversion of corn straw by coupling ensiling and solid-state fermentation. *Bioresource Technology*, 78: 277-280.
- Zamost, B.L., Nielsen, H.K., Starnes, R.L. (1991) Thermostable enzymes for industrial applications. *Journal of Industrial Microbiology*, 8: 71-82.