

ESTUDOS SOBRE A SECREÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp.
SMIA-2 E SUA COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES
COMERCIAIS

WELLINGTA CRISTINA ALMEIDA DO NASCIMENTO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

CAMPOS DOS GOYTACAZES – R.J.

MARÇO – 2005

ESTUDOS SOBRE A SECREÇÃO DE PROTEASES POR *Bacillus* sp.
SMIA-2 E SUA COMPATIBILIDADE COM DETERGENTES
COMERCIAIS

WELLINGTA CRISTINA ALMEIDA DO NASCIMENTO

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

Orientadora: Prof^a Meire Leis Leal Martins

CAMPOS DOS GOYTACAZES – R.J.

MARÇO - 2005

A DEUS

À minha amada mãe, Maria Rita.

A meu pai, Wellington (in memoriam).

A meu querido esposo, Augusto.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por estar sempre presente em minha vida, nos bons momentos e naqueles mais difíceis, fazendo com que tenha força, disposição e saúde para seguir em frente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) pela oportunidade de realização do curso.

A Professora Meire Lelis Leal Martins pela orientação, pelos valiosos ensinamentos, pelo apoio e compreensão que sempre me foram dispensados.

A Professora Karla Silva Ferreira pelas caronas que alegravam meus finais de semana e boa vontade em ajudar no que fosse preciso.

Aos professores Eder Dutra Resende, Rita da Trindade Ribeiro Nobre Soares e Rosa Helena Luchese por terem aceitado contribuir com este trabalho participando da banca de defesa.

A minha mãe Maria Rita, por acreditar em meus sonhos, abrir os meus caminhos com conselhos e muito carinho. Agradeço, sobretudo por seu amor de mãe que me afaga nos momentos de tristeza e se alegra comigo nos momentos de vitória. Cada dia tenho mais certeza de que sozinha, jamais teria chegado até aqui.

Ao meu esposo Augusto, por tudo o que vivemos e ainda vamos viver juntos. Obrigada por dividir comigo a sua estória e me ajudar a construir a minha. Obrigada pela amizade que nos une, pelo companheirismo, respeito e vontade de seguirmos sempre juntos. Hoje esta conquista também é sua!

A minha querida tia Luzia, por estar presente em todos os momentos de minha vida, obrigada pela torcida sincera. Tenho orgulho de tê-la em meu caminho.

A Luíza, pela inocência de seus atos que me fazem perceber o quanto é maravilhoso viver.

Ao meu irmão Waldomiro pela felicidade de saber que posso contar com mais esse apoio. Obrigada pelo carinho e por fazer parte de minha vida.

Ao Geraldo Custódio (Dinho) pela amizade e importante contribuição nas idas e vindas Campos-Visconde do Rio Branco.

A minha família campista-cuiabana, Fred, Cacá, Pedro e Miguel pela cumplicidade, pelo carinho, apoio e tudo o mais que precisei. Neste momento me faltam palavras, não tenho como agradecer tudo o que fizeram por mim. Vocês estarão sempre em meu coração, porque fazem parte dele.

A prima Carol, pela agradável convivência durante minha permanência em Campos.

A prima Camila pelos momentos de descontração, pelas boas risadas que demos juntas, pelo auxílio no encaminhamento final desta tese e por estar sempre pronta a colaborar com o que for preciso.

A Ana Lucia Paes Barbosa pela competência com que conduz seu trabalho, sempre disposta a ajudar, pessoa dedicada, amiga e digna de todos os agradecimentos.

Ao amigo Mário, pelas horas de conversa, pelos momentos de estudo, pela amizade.

A Raquel pelos momentos laboratoriais que passamos juntas.

Aos amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos e da pós graduação, pelo companheirismo durante a realização do curso.

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

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1.INTRODUÇÃO.....	1
2.REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Proteases.....	3
2.1.1. Classificação das proteases.....	4
2.1.2. Fontes de proteases.....	5
2.1.2.1. Proteases de origem vegetal.....	5
2.1.2.2. Proteases de origem animal.....	6
2.1.2.3. Proteases de origem microbiana.....	7
2.2. Microrganismos termofílicos e suas enzimas.....	9
2.3. Otimização das Condições de Cultivo para a produção de proteases.....	11
2.4. Aplicação Industrial de Proteases.....	12
2.5. Utilização de Proteases em Detergentes.....	14
2.6. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas.....	17
3.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1. Microrganismo.....	20

3.2. Manutenção do microrganismo.....	20
3.3. Meios de Crescimento.....	20
3.4. Preparo do inoculo.....	21
3.5. Crescimento do microrganismo.....	21
3.6. Medida do crescimento.....	22
3.7. Determinação da atividade enzimática.....	22
3.8. Influência da fonte de carbono sobre o crescimento e a atividade proteásica.....	22
3.9. Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a atividade proteásica.....	23
3.10.Efeito da suplementação do meio de cultura com metais.....	23
3.11.Efeito da presença do CaCl_2 e K_2HPO_4 no meio de cultura sobre a atividade e estabilidade proteásica.....	24
3.12.Efeito da concentração do citrato trissódico e do nitrato de amônio sobre o crescimento e atividade proteásica.....	24
3.13. Caracterização parcial da protease.....	24
3.13.1. Purificação parcial da enzima.....	24
3.13.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	25
3.13.3. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease....	25
3.13.4. Efeito de íons metálicos e alguns compostos químicos na atividade da protease.....	26
3.13.5. Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas.....	26
3.13.6. Efeito de Ca^{+2} e Mn^{+2} na estabilidade térmica da protease.....	26
3.13.7. Efeito do Ca^{+2} , Mn^{+2} e da glicina na estabilidade térmica da protease.....	26
3.13.8. Efeito de alguns agentes surfactantes e oxidantes na atividade da protease.....	27
3.13.9. Compatibilidade e estabilidade da protease em vários detergentes comerciais.....	27
3.13.10. Efeito do Ca^{+2} , Mn^{+2} e da glicina sobre a atividade e estabilidade da protease em detergentes comerciais.....	28
3.14. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para crescimento e produção de protease por <i>Bacillus</i> sp.	28
3.14.1. Utilização de soro de leite e água de maceração de milho.....	28

3.14.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática.....	29
3.14.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática.....	29
3.14.4. Atividade enzimática em detergentes comerciais da protease produzida em resíduos agroindustriais.....	30
4.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e a atividade proteásica.....	31
4.1.1. Efeito da fonte de carbono.....	31
4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio.....	33
4.1.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com metais.....	35
4.1.4. Influência da presença do K_2HPO_4 e do $CaCl_2$ no meio de cultura, sobre o crescimento e a atividade da protease.....	38
4.1.5. Efeito da concentração do citrato trissódico.....	40
4.1.6. Efeito da concentração de nitrato de amônio	42
4.2. Caracterização parcial da protease.....	43
4.2.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease.....	43
4.2.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease.....	45
4.2.3. Efeito de íons metálicos na atividade da protease.....	47
4.2.4. Influência da temperatura e do tempo de incubação sobre a atividade da protease.....	48
4.2.5. Influência do $CaCl_2$ e $MnSO_4$ na estabilidade térmica da protease	49
4.2.6. Efeito do Cálcio, Manganês e da Glicina sobre a estabilidade térmica da protease.....	53
4.2.7. Efeito de alguns inibidores e surfactantes na atividade da protease.....	55
4.3. Compatibilidade da protease com detergentes comerciais.....	57
4.4. Utilização de soro de leite e água de maceração de milho para a produção da protease	59
4.4.1. Perfil do crescimento e atividade proteásica do <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2.....	61
4.4.2. Caracterização parcial da protease secretada pelo microrganismo quando cultivado no soro de leite e na água de maceração de milho.....	62

4.4.2.1. Temperatura ótima e estabilidade térmica	62
4.4.2.2. Determinação do pH ótimo e estabilidade da enzima ao pH....	65
4.2.3. Atividade enzimática em detergentes comerciais, da protease produzida em resíduos agroindustriais.....	66
5.RESUMO E CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Crescimento e atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 após 9 horas de incubação a 50°C e pH inicial de 7,0, usando diferentes fontes de carbono.....	32
2 Crescimento e atividade da protease de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 9 horas em diferentes fontes de nitrogênio.....	35
3 Efeito de alguns íons metálicos e compostos químicos na atividade da protease.....	48
4 Efeito de vários inibidores ou surfactantes na atividade da protease.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1	Subdivisão das proteases de acordo com o local de quebra do substrato..... 4
2	Principais utilizações industriais de enzimas..... 13
3	Crescimento e produção de protease em função do período de crescimento de <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo citrato trissódico como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio e suplementado com traços de metais..... 36
4	Crescimento e produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50°C em meio líquido contendo citrato trissódico (1%) como fonte de carbono e nitrato de amônio (1%) como fonte de nitrogênio e variando as concentrações de fosfato de potássio e de CaCl ₂ 40
5	Efeito da concentração de citrato trissódico no crescimento e atividade enzimática de <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50°C..... 41
6	Curva de crescimento e produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C no meio líquido contendo 1,5% de citrato trissódico como fonte de carbono..... 42
7	Efeito da concentração de nitrato de amônio no crescimento e

	produção de protease <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C.....	43
8	pH ótimo e estabilidade de protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50 °C por 9h.....	45
9	Temperatura ótima e estabilidade da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2 crescido a 50 °C por 9h.....	46
10	Estabilidade térmica da protease nas temperaturas de 40°C, 60°C e 90°C.....	49
11	Estabilidade térmica da protease em ausência e presença de Ca ⁺² e Mn ⁺² nas temperaturas de 40°C, 60°C, e 90°C.	51
12	Termoestabilidade da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp SMIA-2 a 60 °C , em presença de MnSO ₄ , glicina, glicina + MnSO ₄ , glicina + CaCl ₂ e controle.....	54
13	Compatibilidade da protease de <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 com detergentes comerciais.....	58
14	Compatibilidade da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 com detergente Tide [®] . Em presença de glicina, CaCl ₂ glicina + CaCl ₂ , MnSO ₄ , glicina + MnSO ₄	59
15	Curva de crescimento e produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C no meio basal contendo (a) 1% citrato trissódico e 0,1% de soro de leite e (b) 0,5% água de maceração de milho e 0,1% soro de leite.....	60
16	Curva de crescimento e produção de protease por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, crescendo em soro de leite (0,1%) e água de maceração de milho (0,5%), a 50° C por 60 horas.....	62
17	Temperatura ótima da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho.....	64
18	Estabilidade térmica da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho, em presença e ausência de cálcio.....	64

19	Determinação do pH ótimo da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho.....	66
20	Estabilidade ao pH da protease secretada por <i>Bacillus</i> sp. SMIA-2, crescido em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho à 50°C/36h.....	66
21	Estabilidade da protease produzida por <i>Bacillus</i> sp. espécie SMIA-2, em detergentes comerciais.....	68

RESUMO

NASCIMENTO, Wellingta Cristina Almeida; D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; Março, 2005; Estudos sobre a secreção de proteases por *Bacillus* sp SMIA-2 e sua compatibilidade com detergentes comerciais; Orientadora Profa.: Meire Lelis Leal Martins.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) e teve como objetivo estudar a produção de proteases pelo termofílico *Bacillus* sp SMIA-2 e avaliar sua compatibilidade com detergentes comerciais. A produção de proteases por este microrganismo em culturas líquidas contendo citrato trissódico alcançou o máximo em 9h, com níveis de 1,93U/mg de Proteína. O microrganismo utilizou várias fontes de carbono para a produção da protease, sendo que o amido foi o melhor substrato seguido por citrato trissódico, ácido cítrico e sacarose. Entre as várias fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, o nitrato de amônio foi a melhor.

A redução da quantidade de fosfato inorgânico e adição de CaCl_2 no meio, resultou em um aumento da atividade e da estabilidade da protease. Um aumento da concentração de nitrato de amônio no meio de cultura de 50 mM para 125mM resultou em um decréscimo do crescimento celular e da atividade da enzima.

Estudos sobre a caracterização da protease revelaram que a temperatura ótima desta enzima foi 60 °C. A enzima foi estável por 1h a 30 °C, enquanto a 40 °C e 80 °C, 14% e 84% da atividade original foram perdidas respectivamente. O valor ótimo de pH encontrado para a enzima foi 8,0. Após a incubação da solução

enzimática bruta por 1h a pH 5,5, 8,0, e 9,0 foi observado um decréscimo de em torno de 51%, 18% e 66% da sua atividade original, respectivamente. Um forte efeito inibitório foi observado na presença de K^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} . A presença de Ag^+ resultou na perda completa da atividade da enzima na concentração de 1mM. A atividade foi estimulada pela presença do Mn^{2+} , indicando que este íon teve um papel funcional na estrutura molecular da enzima.

A enzima reteve cerca de 95% e 73% de sua máxima atividade após 1h a $60^{\circ}C$ na presença de glicina em combinação com $MnSO_4$ e $CaCl_2$ respectivamente. A enzima não foi inibida em presença de 1.0 – 5.0mM de EDTA. A adição de Triton X-100 inibiu a atividade enzimática em todas as concentrações estudadas. A enzima não foi estável na presença de uma solução de peróxido de hidrogênio 5%. A protease manteve mais de 80% e 65% de atividade após 30 min de incubação na presença dos detergentes Tide e Cheer respectivamente. Após adição de $CaCl_2$ e glicina, a enzima manteve mais de 85% de atividade após 1 hora de incubação em presença do detergente Tide.

A substituição do nitrato de amônio e citrato trissódico do meio por 0,1% de soro de leite e 0,5% de água de maceração de milho não somente proporcionou uma melhor atividade enzimática, como também atrasou o processo de desativação, que é típico durante a produção de proteases. Em tais condições, a temperatura ótima da protease foi $70^{\circ}C$ e nesta temperatura a enzima foi estável nos detergentes Ultra bizz, Cheer e Tide por 30 minutos.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Wellington Cristina Almeida; D.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March, 2005; Studies of secretion of protease by *Bacillus* sp SMIA-2 and its compatibility with commercial detergents; Adviser: Meire Lelis Leal Martins.

This work was carried out at the Food Technology Laboratory of the Fluminense North State University (UENF) and had as objective to study the production of protease by the thermophilic *Bacillus* sp SMIA-2 and to evaluate its compatibility with commercial detergents.

Protease production by thermophilic *Bacillus* sp cultivated in liquid cultures containing trisodium citrate reached a maximum in 9h, with levels of 1.93U/mgProtein. The micro-organism utilized several carbon sources for the production of protease, starch was the best substrate followed by trisodium citrate, citric acid and sucrose. Among the various organic and inorganic nitrogen sources, ammonium nitrate was found to be the best.

The lowering of the amount of inorganic phosphate and addition of CaCl_2 in the medium, resulted in an improvement of the activity and stability of the protease. It was found that increasing the initial ammonium level in the medium from 50mM to 125mM resulted in a decrease of cell growth and enzyme activity.

Studies on the protease characterization revealed that the optimum temperature of this enzyme was 60 °C. The enzyme was stable for 1h at 30 °C, while at 40 °C and 80 °C, 14% and 84% of the original activities were lost

respectively. The optimum pH of the enzyme was found to be 8.0. After incubation of crude enzyme solution for 1h at pH 5.5, 8.0 and 9.0 was observed a decrease of about 51%, 18% and 66% of its original activity respectively. A stronger inhibitory effect was observed in the presence of K^+ , Hg^{2+} and Cu^{2+} . Ag^+ resulted in the complete loss of activity at 1mM concentrations. Activity was stimulated by Mn^{2+} , indicating that this ion had a functional role in the molecular structure of the enzyme.

The enzyme retained about 95% and 75% of its maximum activity after 1h at 60° C in the presence of glycine in combination with $MnSO_4$ and $CaCl_2$ respectively. There was no inhibitory effect observed at 1.0-5.0 mM of EDTA. Triton X-100 inhibited the enzyme to all concentrations utilized. The enzyme was not stable in peroxide solution in a concentration of 5% (v/v). Protease retained more than 80% and 65% of its activity after 30 min incubation at 60 °C in presence of the detergents Tide and Cheer respectively. After supplementation of $CaCl_2$ and glycine the enzyme with the detergent Tide retained more than 85% of its activity after 1h.

Replacing ammonium nitrate and citrate trissodium in the medium by 0.1% milk whey and corn steep liquor (0.5%) not only produced much better enzyme activity, but also delayed the deactivation process that is typical for the production of proteases. In such conditions, the optimum temperature of the protease was 70° C and in this temperature it was stable in the detergents Ultra bizz, Cheer e Tide for 30 minutes.

1.INTRODUÇÃO

Enzimas são catalisadores biológicos que atuam em uma série de reações químicas, sendo extensivamente explorados no setor de biotecnologia. Atualmente, são usadas comercialmente na indústria de detergentes, de alimentos, farmacêutica, de diagnósticos, e muitas outras indústrias químicas.

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, atuam em condições amenas, são altamente específicas, não produzem efeitos inesperados, podem ser utilizadas no tratamento de resíduos biológicos e são biodegradáveis. As enzimas industriais são utilizadas como beneficiadoras, e sua utilização depende do valor que elas agregam ao produto final. Apenas raramente, como ocorre no caso dos detergentes, o consumidor compra e utiliza as enzimas diretamente.

As enzimas podem ser extraídas de microrganismos, plantas e tecidos animais. As primeiras apresentam uma série de vantagens sobre as demais, tais como custos de produção relativamente mais baixos, susceptibilidade de produção em larga escala em fermentadores industriais, diferentes características físico-químicas, geralmente relacionadas ao habitat e fisiologia do microrganismo produtor (organismos termofílicos em geral produzem enzimas termoresistentes), susceptibilidade de manipulação genética e finalmente por representarem um recurso renovável.

Atualmente, estudos estão sendo realizados visando a utilização de enzimas termoestáveis, sintetizadas por microrganismos termófilos, em vários

processos industriais. A maioria das bactérias termofílicas investigadas pertencem ao gênero *Bacillus* e foram isoladas de ambientes termofílicos e mesofílicos. O grande interesse biotecnológico e comercial na utilização destes microrganismos se deve, dentre outros fatores, ao fato deles crescerem mais rápido, apresentarem sistemas enzimáticos mais estáveis, serem capazes de catalisar reações bioquímicas em temperaturas mais elevadas. Além disso, os problemas de contaminação são grandemente reduzidos quando se trabalha a temperaturas elevadas.

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais e são responsáveis por aproximadamente 60% do mercado total mundial de enzimas (Ng & Kenealy, 1986; Kalisz, 1988; Rao *et al.*, 1998). Entre as várias proteases, as bacterianas são as mais significantes, se comparadas com as proteases de fungos e animais (Ward, 1985). Dentre as bactérias, *Bacillus* sp. são os produtores específicos de proteases extracelulares (Priest, 1977).

Os microrganismos que possuem capacidade de produção de proteases extracelulares são os de maior importância industrial, porém, esta produção é altamente influenciada por componentes do meio de cultura, como as fontes de carbono e nitrogênio, presença de alguns açúcares facilmente metabolizáveis como glicose e presença de íons metálicos. Além disso, vários fatores como aeração, densidade de inóculo, pH, temperatura e tempo de incubação também afetam a quantidade da enzima produzida.

Nos últimos anos, a indústria de detergentes tem modificado suas matérias primas, visando aumentar a qualidade de seus produtos e substituir materiais agressivos por produtos que geram menos impacto ao meio ambiente. O aparecimento de proteases, obtidas por fermentação de bactérias, estáveis em temperaturas altas e pH alcalino, e obtidas em maiores quantidades e menor tempo, com preço reduzido, possibilitou o seu uso em detergentes. (Lima *et al.*, 2001). A produção enzimática mundial destinada ao mercado de detergentes excede, atualmente, os 60%.

Considerando a grande potencialidade do emprego industrial das proteases, este trabalho teve como objetivo avaliar a sua produção por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp SMIA-2. Algumas propriedades bioquímicas da enzima e sua compatibilidade com detergentes comerciais foram também investigadas.

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Proteases

As proteases formam o grupo de enzimas que ocupa a posição mais privilegiada nos campos fisiológicos e comerciais. São enzimas proteolíticas (catalisam a clivagem de ligações peptídicas em outras proteínas) de importância fundamental para o metabolismo e para o sucesso dos processos fisiológicos necessários à manutenção da vida. Além disso, em condições patológicas, realizam funções sintéticas e degradativas e executam uma larga variedade de funções celulares e orgânicas, produzindo sistemas de cascata tais como hemostase e inflamação (Rao et al, 1998, Toshihiko et al, 1999).

A grande variedade de proteases em contraste com sua elevada especificidade de ação tem atraído atenção mundial devido à possibilidade de sua exploração para aplicações médicas e biotecnológicas (Tunga *et al.*, 2003). Dentre estas se destacam as proteases alcalinas, que são utilizadas principalmente como aditivos para a indústria de detergentes (Banerjee et al., 1999).

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).

2.1.1. Classificação das proteases

Conforme a nomenclatura da “International Union of Biochemistry and Molecular Biology” (1992), as proteases são enzimas da classe 3 as hidrolases e subclasse 4 as peptideo-hidrolases ou peptidases. Entretanto, devido a sua diversidade de ação e estrutura, elas não se enquadram no sistema tradicional de nomenclatura enzimática. Comumente são classificadas segundo 1) o tipo de reação catalisada, 2) a natureza química do sítio catalítico e 3) relações evolutivas estruturais. São grosseiramente subdivididas em dois grandes grupos: exopeptidase (EC 3.4.11-19) e endopeptidases (EC 3.4.21-99), de acordo com seu sítio de ação (Barret, 1994; Rao et al, 1998). As endopeptidases são também chamadas proteinases, sendo, portanto, muito comum a utilização do termo proteinase para se referir a uma protease. Essa subdivisão grosseira das proteases pode ser verificada na Figura 1.

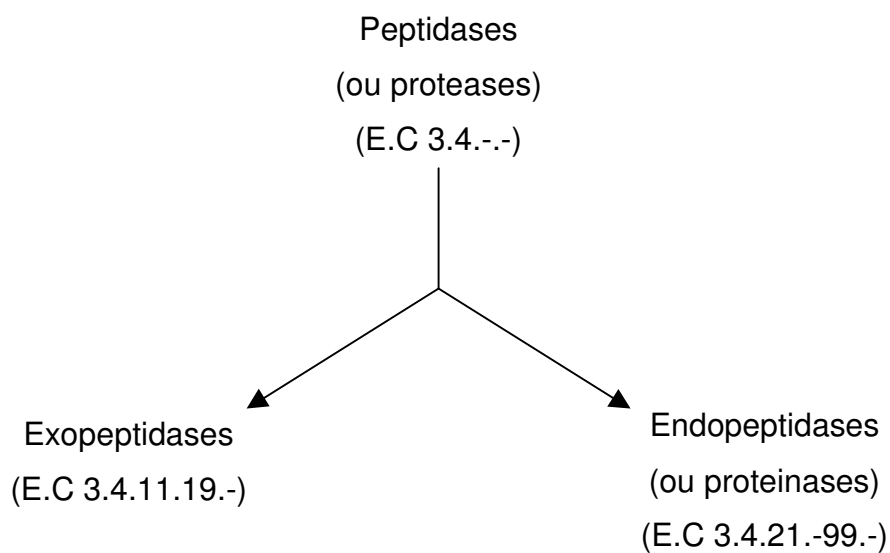


Figura 1- Subdivisão das proteases de acordo com o local de quebra do substrato.

As proteases que clivam as ligações peptídicas próximo ao grupamento amino ou carboxílico do substrato são denominadas exopeptidases. As

exopeptidases podem ser subdivididas em amino peptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino terminal) ou carboxipeptidases (quando clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento carboxílico terminal) (João e Zanella, 2002).

As aminopeptidases são de ocorrência bastante freqüente em uma grande variedade de espécies microbianas, clivando as cadeias polipeptídicas em sua extremidade amino terminal liberando resíduos simples de aminoácidos, dipeptídeos ou tripeptídeos. São em geral enzimas intracelulares embora exista aminopeptidase extracelular produzida por *A. oryzae*. As carboxipeptidases, como o próprio nome sugere, são exopeptidases que clivam as cadeias de proteína na extremidade da carboxila terminal liberando aminoácidos simples ou dipeptídeos (João e Zanella, 2002; Priest, 1977).

As endopeptidases são caracterizadas por sua ação preferencial no interior das cadeias polipeptídicas em locais distantes de suas extremidades. A presença de aminoácidos livres ou grupamento carboxílico exerce um efeito negativo sobre a atividade destas enzimas (João e Zanella, 2002; Priest, 1977).

2.1.2. Fontes de proteases

2.1.2.1. Proteases de origem vegetal

Vários fatores, como a viabilidade do solo para o cultivo e a susceptibilidade de condições climáticas para o crescimento das plantas, são responsáveis pelo controle da utilização dessas fontes de proteases (Godfrey e West, 1996).

Um ponto altamente desfavorável para a utilização de proteases de origem vegetal é a demora no tempo de cultivo para a obtenção destas enzimas. Dentre as principais proteases de plantas, as mais conhecidas são a papaína, a bromelina, as queratinases e a fiscina (Evangelista, 2001).

A papaína, enzima extraída do látex do mamão, possui uma longa história de uso e seu desempenho depende da fonte, das condições climáticas de desenvolvimento das plantas e dos métodos utilizados para sua extração (Fennema, 1996).

A atuação da papaína se dá na faixa de pH que varia de 5 a 9 e em temperaturas que podem variar de 80 a 90°C. Elas atuam sobre o colágeno e a elastina, que são constituintes do tecido conjuntivo, possuindo pouca ação sobre as fibras musculares. Podem ser encontradas em pó, de cor geralmente canela clara e em líquido incolor ou amarelo claro (Evangelista, 2001).

A bromelina é uma enzima extraída do talo ou do suco de abacaxi, caracterizada como uma cisteína proteinase e ativa na faixa de pH que varia de 5 a 9, possuindo uma temperatura de inativação menor que da papaína, isto é, de 70°C. Sua função é análoga à da papaína e podem ser encontradas comercialmente na forma de pó, com uma tonalidade esbranquiçada a marrom claro (Fennema, 1996).

Outra protease de origem vegetal é a ficina, retirada do látex do *Fícus* sp., que abrange diferentes tipos de figueiras tropicais. Possui as mesmas indicações da papaína e da bromelina, sendo, porém, menos requisitada. Apresenta atividade elevada em presença de agentes quelantes como EDTA, possui ótima estabilidade em valores de pH que variam entre 6 e 8 e catalisam a hidrólise de uma grande variedade de substratos naturais, incluindo a gelatina, colágeno, proteínas do leite, hemoglobina, elastina, proteínas da soja, fibrina e fibrinogênio (Rao et al., 1998; Evangelista, 1996).

As queratinases são enzimas de origem vegetal responsáveis pela clivagem de pêlos, cuja digestão é de grande importância para a produção de aminoácidos essenciais como lisina e para a desobstrução de sistemas de tratamento de efluentes (Godfrey e West, 1996).

2.1.2.2. Proteases de origem animal

A produção das proteases de origem animal, depende da viabilidade de estoques vivos para sua retirada, o que é controlado por políticas agropecuárias e governamentais. Além disso, o elevado preço destas enzimas, aliado ao crescimento de sua utilização, resultou em um maior interesse por enzimas de origem microbiana. As principais proteases de origem animal são a tripsina pancreática, a quimotripsina e a renina (Rao et al., 1998).

A tripsina, enzima responsável pela hidrólise das proteínas dos alimentos no sistema digestivo dos animais, é uma serina protease que hidrolisa cadeias

peptídicas no grupamento carboxílico constituído por resíduos de lisina ou arginina. Esta enzima tem recebido atenção especial nos últimos anos, com relação ao controle de insetos, baseado na capacidade de inibidores de proteases inibirem a ação desta enzima no intestino dos insetos. Na indústria de alimentos sua utilização é bastante limitada devido à formação de hidrolisados que possuem sabor amargo. São basicamente utilizadas no preparo de meios de cultura e em algumas aplicações médicas especializadas (Godfrey e West, 1996; Rao et al., 1998).

A quimotripsina é uma enzima encontrada em extratos pancreáticos de animais. Seu extrato na forma pura possui um preço muito elevado fazendo com que sua utilização seja muito restrita, concentrando-se em aplicações analíticas ou no caso de diagnósticos (Evangelista, 2001).

Uma enzima de origem animal bastante utilizada nas indústrias de laticínios para a produção de queijos é a quimosina, que hidrolisa a ligação peptídica entre os aminoácidos Phe₁₀₅ – Met₁₀₆ da K-caseína, liberando dois macropeptídios altamente negativo que é estabilizador da micela. A ação inespecífica da renina sobre outras proteínas é denominada proteólise e resulta na formação de peptídeos amargos, dissolução do coágulo e redução do rendimento da fabricação de queijos (Sgarbieri, 1996).

De acordo com Sgarbieri, 1996, a enzima que antes era extraída exclusivamente a partir de estômagos de ruminantes jovens, hoje é produzida por microrganismos devido ao crescimento mundial da produção de queijos.

2.1.2.3. Proteases de origem microbiana

De acordo com Gacesa e Hubble (1990), é possível identificar uma série de fases ao longo do desenvolvimento da indústria enzimática. A princípio, as preparações eram obtidas basicamente de extratos animais e vegetais com pequena contribuição microbiana. Com o crescimento da demanda por enzimas, houve uma limitação de materiais animais e vegetais levando a um aumento da demanda por enzimas microbianas, as quais começaram a ser utilizadas em larga escala.

A procura por novas enzimas começa na natureza, pois esta é abundante em microrganismos dos quais apenas uma pequena fração é atualmente conhecida. A terra e a água são as principais fontes de microrganismos. Um grama de terra pode conter milhões e milhões de bactérias, fungos e outros organismos. Amostras são coletadas no mundo todo, desde a tundra congelada no topo do mundo até o fundo das águas quentes dos Açores. Mas, os microrganismos que produzem enzimas estão presentes também em lugares comuns. Uma das enzimas utilizadas atualmente para extrair açúcar do amido foi extraída de um microrganismo encontrado em uma amostra de terra do Jardim Botânico de Copenhagen na Dinamarca (Novozyme, 2002).

Os microrganismos representam uma excelente fonte de enzimas devido à sua ampla diversidade bioquímica e susceptibilidade de manipulação genética. Isto fez com que as proteases microbianas respondessem hoje por aproximadamente 40% do custo mundial de enzimas, sendo preferidas em relação às de animais ou de plantas, por apresentarem quase todas as características desejáveis para sua aplicação biotecnológica (Rao *et al.*, 1998; Kumar e Takagi, 1999).

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.*, 2002a).

Dentre os microrganismos as bactérias são as principais fontes de proteases, devendo-se destacar o gênero *Bacillus* sp. (Haki e Rakshit, 2003).

Atualmente, as proteases microbianas são amplamente utilizadas no processamento de alimentos, indústria têxtil e farmacêutica, na produção de detergentes (biológicos), química bio-orgânica, biologia molecular e aplicações médicas. A ampla utilização destas enzimas é reflexo da elevada especificidade de sua ação como biocatalizadores (Phadataré, et al., 1993, Mandigan et al., 1996; Horikoshi, 1999; Kanekar, et al., 2002).

As enzimas de origem microbiana podem ser intracelulares ou extracelulares. As proteases intracelulares são importantes para vários processos metabólicos e celulares, como na esporulação, diferenciação, e manutenção do “pool” de proteínas intracelular, enquanto que as proteases extracelulares são importantes para a hidrólise de proteínas no meio externo, permitindo a absorção dos nutrientes pelos microrganismos (Gupta et al., 2002b).

De acordo com Gacesa e Hubble (1990) e Wiseman (1985) as enzimas extracelulares possuem uma série de vantagens sobre as intracelulares. Primeiro que 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.

As enzimas microbianas extracelulares, devido à sua secreção direta no meio de crescimento, também apresentam vantagens sobre as proteases de origem animal ou vegetal (Gupta et al., 2002a).

2.2. Microrganismos termofílicos e suas enzimas

Microrganismos capazes de crescer em temperaturas acima de 55°C, são chamados microrganismos termofílicos e são classificados como bactérias ou *archae*. As enzimas produzidas por estes microrganismos são conhecidas como termoenzimas ou enzimas termoestáveis e possuem uma temperatura ótima de atividade por volta de 60°C (Tolner et al., 1997; Vieille e Zeikus, 1996; Andrade et al., 1999)

A capacidade de adaptação a alterações ambientais é uma das características mais impressionantes da vida na terra. A adaptação de microrganismos em condições ambientais extremas obrigou-os a desenvolver componentes celulares e estratégias bioquímicas para conseguir a sobrevivência. Estas estratégias implicam na estabilização de todos os componentes celulares de modo que sua funcionalidade seja mantida em condições que seriam danosas para a maioria das biomoléculas dos organismos mesofílicos (Santos et al., 2001).

Recentemente, grande número de bactérias termofílicas tem sido isoladas e caracterizadas. Esses microrganismos tem sido encontrados como habitantes

de áreas vulcânicas continentais e submarinas e em sedimentos marinhos com aquecimento geotermal (Novozyme, 2002).

A descoberta de microrganismos termofílicos abriu novas oportunidades para descoberta de enzimas, que apresentam atividades em condições extremas de temperatura, possibilitando seu uso em muitos processos industriais onde esta condição é necessária (Hough e Danson,1999; Andrade et *al.*,1999;Banerjee et *al.*, 1999).

As macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos são inativadas irreversivelmente pelo calor, mas em microrganismos termofílicos estes componentes são mais estáveis (Ward e Young, 1988). As enzimas produzidas por estes microrganismos possuem temperatura ótima de atividade próxima a temperatura ótima de seu crescimento (Brock, 1985).

A estabilidade térmica das proteínas tem sido atribuída à sua maior hidrofobicidade, maior enovelamento, redução dos pontos de ramificação, redução do número e tamanho das cavidades, substituição de resíduos aminoacídicos na estrutura secundária externa, aumento nos resíduos de prolina, redução da ocorrência de resíduos termolábeis, aumento no conteúdo helical, aumento na quantidade de pontes de hidrogênio e maior formação de pontes salinas (Kumar, 2001; Jaenicke, et.al, 1998; Szilágyil e Závodszky, 2000; Scandurra et al., 1998).

O crescente interesse biotecnológico pelas enzimas produzidas por termofílicos é motivado por sua capacidade de trabalhar em condições em que as enzimas produzidas por microrganismos mesofílicos são geralmente desnaturadas. (Hough e Danson,1999) .

A busca por estas enzimas baseia-se no fato de que a utilização de uma temperatura mais elevada em um processo industrial, faz com que a velocidade da reação seja aumentada, necessitando da utilização de uma menor quantidade de enzimas, já que cada aumento de 10°C na temperatura promove uma aumento de aproximadamente duas vezes na velocidade de 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. A viscosidade do substrato é reduzida e a solubilidade dos reagentes aumentada

com a elevação da temperatura, fazendo com que as misturas sejam mais homogêneas (Zamost et al., 1991; Wiseman, 1985).

2.3. Otimização das Condições de Cultivo para a produção de proteases

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

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 um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático (Kumar e Takagi, 1999).

O maior foco para o aumento na produção de proteases está centrado na otimização do meio de cultura. Os meios sintéticos estão sendo mais utilizados que os meios complexos devido à possibilidade de alteração de substratos, além de permitir maior controle e monitoramento do processo e por simplificar o processo de separação de enzimas (Haki e Rakshit, 2003).

Em termos práticos a otimização da composição do meio é realizada para conseguirmos um balanço entre seus diversos componentes, minimizando-se assim a quantidade de compostos que não estão sendo utilizados pelo microrganismo até o final do processo de fermentação.

De acordo com Kumar e Takagi (1999), os enfoques das pesquisas que buscam a otimização dos meios de cultura para a produção enzimática, estão centrados: 1) na avaliação dos efeitos das fontes de carbono e nitrogênio tanto em nível de substrato quanto de custo para aumentar a produtividade enzimática; 2) requerimento de íons metálicos bivalentes no meio de fermentação; 3) otimização das condições ambientais e dos parâmetros de fermentação como pH, temperatura, aeração e agitação.

A adição de alguns íons metálicos como Ca^{+2} , Ba^{+2} , Mg^{+2} , Mn^{+2} , Co^{+2} , Fe^{+3} e Zn^{+2} podem aumentar a estabilidade das enzimas. Esses metais protegem as enzimas contra a desnaturação térmica, possuindo um papel vital na manutenção de sua atividade catalítica (Gupta et al., 2002a).

2.4. Aplicação Industrial de Proteases

O homem explora involuntariamente as enzimas para a produção de alimentos e bebidas como o pão, o queijo, a cerveja e o vinho desde a antiguidade. Na década de 50, época em que foram descobertas grandes variedades de enzimas presentes nas células vivas, bem como seu modo de ação, foram dados os primeiros avanços na tecnologia enzimática. Os pesquisadores descobriram que extrair e purificar enzimas microbianas aumentam a eficácia, ou seja, que as enzimas isentas de células não perdem sua atividade, “funcionando” de modo mais eficiente (Ferreira, 2002; Haki e Rakshit, 2003).

Em 1995, o mercado mundial de enzimas movimentou cerca de um bilhão de dólares, em valores de venda (Kashyap et al, 2001), dos quais as proteases contabilizaram 60% deste montante (Rao et al.,1998), representando um dos três maiores grupos de enzimas industriais.

A utilização industrial de enzimas está em franco desenvolvimento e de acordo com Godfrey e West, 1996, as estimativas de comercialização neste setor em 2005 situa-se por volta de 1,7 a 2 bilhões de dólares, em todo o mundo.

A distribuição dos segmentos que mais utilizam esses catalisadores, de acordo com Lima et al.,2001, é mostrado na Figura 2.

A utilização de enzimas na indústria de alimentos tem sido limitada devido a necessidade de se manter as condições assépticas, o que é difícil devido a desnaturação enzimática a elevadas temperaturas. Esse problema vem sendo contornado com a aplicação cada vez mais crescente de enzimas termofílicas (Andrade et al., 1999).

Nas indústrias de panificação as proteases são empregadas para a maturação do glúten, melhorando a qualidade da farinha de trigo pela melhoria do sabor, volume e textura do mesmo. Como conseqüência, na elaboração do pão, obtém-se maior expansão e elasticidade da massa, além da redução do período de mistura (Sgarbieri, 1996).

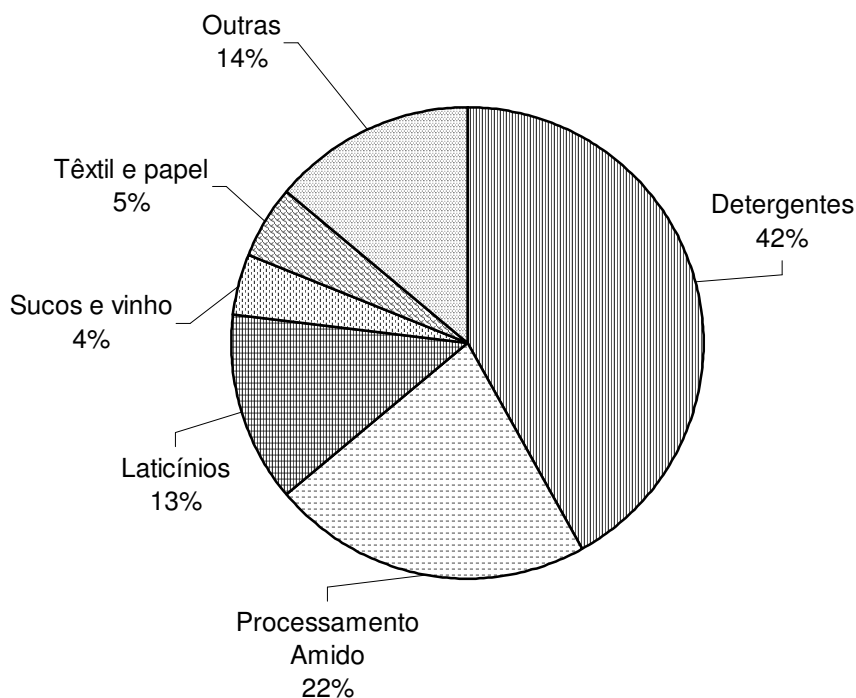


Figura 2 – Principais utilizações industriais de enzimas (Adaptado de: Lima *et al.*, 2001).

Pode ser observado que dentre todas as utilizações industriais de enzimas, destaca-se as indústrias de detergentes, que responde por cerca de 42% da demanda por estes catalisadores (Fig.2).

Dentro do processamento de carnes, as proteases são utilizadas para seu amaciamento artificial e a aplicação destas enzimas pode ser realizada por imersão, pulverização, adicionadas a condimentos ou por injeção direta em animais vivos ou logo após abate. Além disso, as proteases podem ser utilizadas para a limpeza de ossos facilitando a separação mecânica da carne (Evangelista, 2001; Sgarbieri, 1996; Godfrey e West, 1998).

As proteases são também muito utilizadas nas indústrias de laticínios, seja para a fabricação de queijos pela utilização da renina, hoje produzida por microrganismos, ou para a aceleração de sua maturação, pela utilização de proteases fúngicas ou bacterianas, como as produzidas por *Aspergillus oryzae*, *Bacillus subtilis* e *Penicillium roqueforti* (Sgarbieri, 1996; Furtado, 1999; Rao et al., 1998).

As enzimas proteolíticas tanto de origem microbiana quanto de origem vegetal são usadas na indústria de cerveja para a redução da turbidez do produto quando este é resfriado em temperaturas inferiores a 10°C. De acordo com

Sgarbieri, 1996, esta turbidez, de origem química, ocorre devido a formação de um complexo entre os taninos e os polipeptídeos durante o resfriamento da cerveja.

A extração de óleos de algumas sementes tem sido aumentada pelo tratamento com enzimas proteolíticas produzidas por *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. Um estudo realizado sobre o assunto mostrou que o emprego de proteases produzidas por *Bacillus licheniformis* aumentou o rendimento de extração em 16%, enquanto a enzima produzida por *Bacillus subtilis* promoveu um aumento de 60% e a protease produzida por *Aspergillus niger* conferiu um aumento ainda maior, da ordem de 90%. (Sgarbieri, 1996; Kumar e Takagi, 1999).

O processamento de couro envolve a aplicação de compostos químicos perigosos que criam sérios problemas de poluição. A utilização de enzimas proteolíticas tem se mostrado eficiente na substituição destes compostos para remoção de proteínas não fibrilares como as albuminas e globulinas, aumentando a qualidade do couro, devido a sua elevada especificidade e reduzindo problemas de poluição ambiental (Rao et al., 1998).

Nas indústrias farmacêuticas, as proteases são usadas para a obtenção de hidrolisados de aminoácidos que são utilizados como componentes de dietas, em formulações infantis e suplementos para nutrição clínica (Rao et al., 1998; Kumar e Takagi, 1999).

2.5. Utilização de Proteases em Detergentes

A história da utilização de enzimas em detergentes, teve início por volta do ano de 1914, quando dois cientistas, Rohm e Haas, produziram o primeiro detergente enzimático que consistia de carbonato de sódio adicionado de extrato bruto de enzimas pancreáticas. O produto recebeu o nome de Burnus. Porém, o primeiro detergente a utilizar enzimas microbianas foi fabricado em 1956 com o nome de Bio-40 e somente em 1963 uma protease alcalina, a alcalase, foi efetivamente incorporada em um detergente em pó, o qual recebeu o nome de Biotex e foi fabricado pela indústria Novo Industry S/A (Rao et al., 1998; Gupta et al., 2002b).

A indústria de detergentes está em franco crescimento, com a utilização de várias enzimas que atuam na faixa alcalina de pH. Estes detergentes contêm diferentes enzimas, como as proteases, amilases e lipases e são vendidos a nível mundial com vários nomes diferentes. Essa gama de enzimas utilizadas se deve aos diferentes substratos nos quais podem atuar. As proteases hidrolisam proteínas, as amilases são efetivas sobre amido e outros carboidratos, enquanto as lipases vão atuar sobre óleos ou gorduras (Novozyme, 2002; Banik e Prakash, 2004).

De um modo geral, os produtos que contêm enzimas respondem por 89% do mercado de detergentes fabricados nos Estados Unidos, Europa e Japão sendo as proteases as enzimas mais comumente empregadas para esta finalidade (Stoner *et al.*, 2004).

De acordo com Kumar e Takagi (1999), para a utilização de uma protease em detergentes, elas devem preencher alguns requisitos como possuir elevada atividade e estabilidade em uma ampla faixa de pH e temperatura, além de serem efetivas em baixas concentrações (0,4 – 0,8%) e serem compatíveis com vários detergentes comerciais e agentes oxidantes e seqüestrantes usados em sua formulação. Algumas condições de limpeza são menos drásticas que outras, como é o caso de soluções de limpeza de lentes de contato, que não requerem a estabilidade térmica das enzimas empregadas.

Nas indústrias de laticínios e processamento de alimentos, o emprego de membranas de ultrafiltração e osmose reversa vêm crescendo muito nos últimos anos. E com esse aumento, as indústrias de detergentes têm se preocupado em produzir compostos que são eficazes na remoção de proteínas que aderem às membranas. Isto tem sido conseguido com a utilização de proteases nestas formulações (Kumar e Takagi, 1999).

Detergentes de uso internacional como Dynamo[®], Era plus[®] (Protecter & Gamble), Tide[®] (colgate Palmolive) contêm enzimas proteolíticas, produzidas por bactérias do gênero *Bacillus* (Anwar e Saleemuddin, 1998; Rao et al., 1998; Joo e Chang, 2005).

As proteases utilizadas na indústria de detergentes resistem à valores de pH que variam de 9 a 13, são termoestáveis e consistem geralmente em serino proteases secretadas por *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*. As metaloproteases não podem ser utilizadas devido à presença de agentes

quelantes nas soluções de detergentes, que podem reduzir a atividade destas enzimas por seqüestrarem os íons metálicos necessários para seu mecanismo catalítico (Wiseman, 1985).

O ponto isoelétrico das enzimas é outro parâmetro importante a ser levado em consideração quando se deseja aplicá-las em detergentes. De acordo com Gupta et al., 2002b, as proteases trabalham melhor quando o pH das soluções detergentes é próximo ao valor de seu ponto isoelétrico.

O aumento da utilização de proteases como aditivo de detergentes deve-se principalmente à capacidade de limpeza destas enzimas, melhorando a eficiência além de permitir a utilização de temperaturas mais baixas na lavagem e períodos curtos de agitação após a etapa preliminar de lavagem (Kumar e Takagi, 1999).

De acordo com Godfrey e West (1996), os mecanismos que levam à redução da atividade das enzimas nas soluções detergentes durante o período de estocagem ou mesmo durante sua utilização, podem ser:

- Desnaturação: como resultado da elevada temperatura ou devido a exposição em condições severas que podem ocasionar a desestabilização da enzima.
- Reações químicas: hidrólise da cadeia peptídica ou resíduos de aminoácidos devido ao elevado pH ou oxidação de aminoácidos devido a presença de agentes oxidantes nos detergentes.
- Proteólise: todas as enzimas, por serem proteínas, podem ser degradadas por proteases.

Proteases são utilizadas em todos os tipos de detergentes, inclusive naqueles utilizados em máquinas automáticas de lavagem e sua função é a degradação de compostos tipicamente proteínicos como sangue, manchas de ovos e leite. Até o presente momento, menos de 15 moléculas diferentes de enzimas são utilizadas em todo mundo na indústria de detergentes. Essas enzimas são originárias de microrganismos, entre eles *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. clausei*, *B. lentus*, *B. alkaliphilicus* e *B. haloduram* (Maurer, 2004).

2.6. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais na Produção de Enzimas

A geração de resíduos agroindustriais constitui um dos maiores problemas enfrentados pelas indústrias processadoras de alimentos, devido aos problemas ambientais oriundos do descarte destes produtos (Tavares et al. 1998). Em se tratando dos recursos hídricos, o seu correto aproveitamento, além de melhorar a qualidade de vida da comunidade, pode gerar novos investimentos em diferentes setores da economia (Macêdo, 2000).

O lançamento indevido de resíduos sólidos, líquidos e gasosos de diferentes fontes ocasiona modificações nas características do solo, da água e do ar, podendo poluir ou contaminar o meio ambiente. Atualmente, algumas indústrias brasileiras estão realizando programas internos para reciclagem dos seus resíduos, pois a segregação do material, ainda na fonte geradora, diminui o volume total de resíduos, reduz os gastos operacionais e, em alguns casos, pode gerar uma nova receita para indústria (ANA,2002).

De acordo com Macêdo (2002) a preferência dos consumidores por produtos verdes, ou seja que não causem impacto para o meio ambiente, já está sendo comprovada. Segundo este autor, a empresa que gera impactos ambientais por meio de suas linhas de produção infringe a legislação vigente, além de se desgastar perante o consumidor, que prefere até pagar mais caro por produtos que causem menor dano ao meio ambiente.

A necessidade de aproveitamento dos resíduos industriais é uma preocupação cada vez mais crescente. Um estudo realizado por Ellouz et al. (2001) mostrou a possibilidade do aproveitamento de vísceras de peixes como fonte de proteínas para crescimento microbiano e produção de proteases por *Bacillus subtilis*. Os autores concluíram que cabeça e víscera de peixe em determinadas combinações contém fatores nutricionais que estimularam a produção de proteases, podendo ser uma alternativa altamente eficaz para redução do custo de produção desta enzima.

Desta maneira, grandes quantidades de bioprodutos provenientes do processamento da indústria de alimentos podem ser recuperadas e modificadas, ao invés de descartadas. Hidrolisados protéicos de leite e vegetais produzidos pela ação de proteases bacterianas, já são utilizados como ingredientes

alimentícios e produtos industriais, de acordo com suas propriedades funcionais (i.e. capacidade de retenção de água, solubilidade, emulsificação, habilidade de formação de espuma etc.) (Kristinsson e Rasco, 2000).

Em um estudo realizado por García-Gil, et.al., 2000, foi verificado que a aplicação de resíduos industriais no solo, visando sua fertilização promoveu um incremento no crescimento de microrganismos bem como na atividade de algumas enzimas como urease, catalase, protease, entre outras.

Em razão da produção de álcool etílico e de açúcar cristal a partir de cana de açúcar, estima-se que existe um grande excedente de bagaço de cana que não é utilizado para a geração de energia. Aguiar e Menezes, 2002, obtiveram resultados satisfatórios quando utilizaram enzimas na conversão de material celulósico, proveniente do bagaço de cana, em glicose.

Gessesse et al., 2003, utilizaram penas de galinha para o crescimento de *B. pseudofirmus* e *Nesterkonia* sp., ambos isolados de uma região rica neste substrato. A utilização desses microrganismos facilitou a hidrólise das proteínas presentes nas penas, permitindo a produção de aminoácidos que poderão ser utilizados posteriormente para rações animais.

Em um estudo realizado pelo CETEC-MG (1999), sobre o controle ambiental de pequenos e médios laticínios de Minas Gerais, ficou constatado que o soro, parte líquida obtida na fabricação do queijo, se constitui no resíduo que causa maior preocupação pela sua alta taxa de matéria orgânica. Segundo os pesquisadores, o soro lácteo em si não é poluente, mas quando é lançado em curso d'água provoca efeito poluidor devido ao consumo do oxigênio da água.

O soro lácteo é, sobretudo uma matéria prima nobre e rica, da qual se pode ainda obter muito em termos quantitativos e qualitativos. Do soro rejeitado anualmente no Brasil (1.000.000 t) poderiam ser extraídas 70.000 t de materiais, correspondendo a 50.000 t de lactose e 7.500 t de proteínas. A utilização do soro na elaboração de produtos lácteos, ou como substrato biotecnológico para produção de enzimas, contribui em muito para a redução do custo operacional da produção, bem como para a preservação do meio ambiente (Ferreira e Mosquim, 1998).

O soro de leite é um resíduo altamente rico em proteínas, respondendo por 20% das proteínas encontradas no leite. Deste montante as proteínas mais

abundantes são a κ -lactoglobulina (50%), a α -lactalbumina (12%), as imunoglobulinas (10%), albuminas (5%) e peptonas (0,23%) (Siso, 1996).

A produção de enzimas microbianas utilizando soro de leite foi realizada por diversos pesquisadores (Feijoo et al., 1999; Romero et al., 2001; Kosikowski, 1979) e a produtividade enzimática aumentou com o uso deste substrato.

Milho e outros grãos são processados para a produção de óleo, amido, adoçantes, etanol e outros produtos. Destes processamentos são gerados resíduos como a água de maceração de milho (Corn steep liquor), que é um subproduto rico em carboidratos, aminoácidos, peptídeos, minerais, metais, vitaminas e fosfato (Frain et al., 1996; Sigma, 1999).

Vários autores (Kona et al., 2001; Burkert et al., 2004; Lee et al., 2003) sugerem a utilização da água de maceração de milho para a redução do custo do meio de cultura utilizado para o crescimento e produção de enzimas por microrganismos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

Uma bactéria termofílica isolada por Nunes e Martins (2001) a partir de amostras de solo da região de Campos dos Goytacazes foi utilizada neste estudo. Segundo estes autores, os resultados da comparação das seqüências de 16S rRNA indicaram que o isolado possui 94% de similaridade com *B. caldoxylyticus* e *Bacillus* sp. espécie AK1.

3.2. Manutenção do microrganismo

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

3.3. Meios de Crescimento

Meio 1: Inicialmente o meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo e conseqüente produção enzimática possuía a seguinte composição (g/L de água destilada): glicerol 20; peptona 4,5; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0.

Meio 2: O meio 1 foi otimizado para conter as fontes ideais de carbono e nitrogênio, passando a ter a seguinte composição (g/L de água destilada): melhor fonte de carbono 10; melhor fonte de nitrogênio 10; peptona 1; KCl 0,3; MgSO₄ 0,5; K₂HPO₄ 2,0.

Meio 3: Após adequação das fontes de carbono e nitrogênio, o meio 2 foi acrescido de traços de metais. A composição do meio então, foi a seguinte (g/L de água destilada): citrato trissódico 10; NH₄NO₃ 10; peptona 1; 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.

3.4. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado semeando o microrganismo em placas de petri contendo o meio TSY.

As placas foram incubadas em estufa QUIMIS modelo Q 315 D26 a 50°C por 18 horas. Após este período, 10 mL de cada um dos meios de crescimento foram transferidos para as placas para ressuspender as células que foram posteriormente sugadas com o auxílio de uma pipeta estéril. Estas células foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 50mL do respectivo meio de crescimento, incubadas por mais 18 horas à 50°C e posteriormente utilizadas para inocular o meio de crescimento. Este meio foi denominado pré-inóculo.

3.5. Crescimento do microrganismo

O meio de cultura foi inoculado com 2mL de uma cultura de véspera (pré-inóculo) e incubado a 50°C em um “shaker” rotatório (Thermo forma Orbital Shaker, Ohio, USA) operando a 150 rpm. A intervalos de tempos pré determinados foram retiradas amostras para determinação do crescimento, pH e da atividade enzimática. Todos os experimentos foram realizados com três repetições.

3.6. Medida do crescimento

O crescimento do microrganismo foi determinado pela medida da turbidez do meio de crescimento, medindo-se a DO 470nm com a utilização de um espectrofotômetro Hitachi modelo U-2000.

3.7. Determinação da atividade enzimática

As células foram separadas por centrifugação (4500g/15min.) a 4°C, em uma centrífuga modelo Hermle Z 382 e o sobrenadante livre de células utilizado para determinação da atividade enzimática.

A atividade enzimática foi determinada em triplicata pela quantificação de peptídeos solúveis em ácido tricloroacético (TCA) 15%. O substrato utilizado para essa determinação foi uma solução de azocaseína 0,2% (p/v) preparada em tampão TRIS/HCl (pH 6,5), exceto quando mencionado.

Nesta análise, 0,5mL do extrato enzimático foi colocado em 1,0 mL de substrato e incubado em banho-maria a 50°C/10 min., exceto quando mencionado. A reação foi paralisada pela adição de 0,5mL de TCA, centrifugada (Hermele Z 382K) a 15000g/5min. a 4°C e o sobrenadante colocado em tubos de ensaio contendo 0,5 mL de uma solução de NaOH 1N. 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 da enzima foi definida como a quantidade da enzima requerida para produzir um aumento na absorvância a 420 nm igual a 0,1 em 60 minutos.

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, com as modificações propostas por Petterson (1977).

3.8. Influência da fonte de carbono sobre o crescimento e a atividade proteásica

A influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento do microrganismo e sobre a atividade da protease foi investigado cultivando o microrganismo no Meio 1 acrescido individualmente das seguintes fontes de

carbono à 1,0%: citrato trissódico, D(+) galactose, lactose, sacarose, maltose, amido, D(+) glicose, D(+) manose, L(+) arabinose, caseína, D(+) xilose, frutose e ácido cítrico.

Os meios foram esterilizados em autoclave à 121 °C por 15 minutos, foram inoculados com 2mL de pré-inóculo e incubados a 50° C por um período de 9 horas.

Após este tempo a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da protease dosada nos filtrados da cultura.

3.9. Influência da fonte de nitrogênio sobre o crescimento e a atividade proteásica

A influência de diferentes fontes de nitrogênio sobre a atividade da enzima e sobre o crescimento microbiano foi também estudada. O experimento foi desenvolvido, cultivando o microrganismo no Meio 1 contendo Citrato trissódio 1,0%, acrescido individualmente das seguintes fontes de nitrogênio à 1,0%: NH_4NO_3 , peptona (0,1; 0,2; 0,3; 0,5 e 1,0%), extrato de levedura, extrato de carne, caseína, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , KNO_3 , uréia, citrato de amônio e $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Os meios foram esterilizados em autoclave à 121 °C por 15 minutos, foram inoculados com 2mL de pré-inóculo e incubados a 50° C por um período de 9 horas.

Após este tempo a densidade ótica da cultura foi registrada e a atividade da protease dosada nos filtrados da cultura.

3.10. Efeito da suplementação do meio de cultura com metais

Depois de definido a melhor fonte de carbono e nitrogênio, o meio de crescimento foi suplementado com uma solução de traços de metais. O experimento foi conduzido cultivando-se o microrganismo no meio 2 e no meio 3.

Os meios foram esterilizados em autoclave a 121°C/ 15 minutos, inoculados com 2mL de pré-inóculo e incubados a 50°C por um período de 12horas.

A cada 1 hora foram retiradas amostras para determinação do crescimento e atividade da protease nos filtrados da cultura.

3.11. Efeito da presença do CaCl_2 e K_2HPO_4 no meio de cultura sobre a atividade e estabilidade proteásica

Para esta investigação o Meio 3 foi suplementado inicialmente com 0,2M ou 2,0 mM de CaCl_2 e posteriormente a concentração de K_2HPO_4 que era de 11mM no meio inicial, foi reduzida para 5,0 mM e 0,5 mM. Os meios foram esterilizados em autoclave à $121^\circ\text{C}/15$ min e incubado com 2 mL do pré-inóculo.

Após a inoculação, os frascos foram incubados a 50°C e em intervalos de uma hora, foram retiradas amostras para determinação do crescimento, pH e atividade enzimática.

3.12. Efeito da concentração do citrato trissódico e do nitrato de amônio sobre o crescimento e atividade proteásica

O Meio 3 contendo a concentração ideal de CaCl_2 e de K_2HPO_4 foi utilizado para este experimento. Várias concentrações do citrato trissódico (0,75%, 1,0% e 1,5%) e do nitrato de amônio (20mM, 50mM e 125mM) foram utilizadas para avaliar o seu efeito sobre o crescimento e atividade proteásica.

Após a inoculação dos frascos contendo o meio de cultura com as respectivas concentrações da fonte de carbono e de nitrogênio, os mesmos foram incubados a 50°C e a intervalos de uma hora, foram retiradas amostras para determinação do crescimento, pH e atividade enzimática.

3.13. Caracterização parcial da protease

3.13.1. Purificação parcial da enzima

O microrganismo foi cultivado no Meio 3 contendo citrato trissódico (1%), nitrato de amônio (50 mM) e suplementado com CaCl_2 (2mM) e KH_2PO_4 (5mM) a 50°C . Após 9 horas de crescimento, o meio foi centrifugado a 4500g por 15 minutos e o sobrenadante livre de células tratado com NH_4SO_4 60%. Após 18 horas de repouso a 4°C , o caldo foi novamente centrifugado (9000g/30min.). Em seguida o precipitado foi ressuscitado em tampão tris/HCl 0,01M, pH 7,0,

dialisado contra o mesmo tampão a 4°C/18horas e concentrado por liofilização. O material liofilizado foi mantido sobre refrigeração até o uso.

3.13.2. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

A influência do pH sobre a atividade da protease foi avaliada na faixa de 5,0 a 9,0 com intervalo de 0,5 unidade. Para o preparo do substrato foi utilizado uma mistura tamponante contendo tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato de sódio, pH 6,0-8,0 e tampão Tris/HCl, pH 8,5 e 9,0. Os valores de pH da mistura de reação foram ajustados com NaOH ou HCl 1N.

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato (azocaseína 0,2%) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando o mesmo com 0,5 mL do extrato enzimático em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.7.

A estabilidade da protease a diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato enzimático sem substrato, nos tampões anteriormente descritos, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da protease foi determinada conforme descrito no item 3.7.

3.13.3. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade da protease

A determinação da temperatura ótima foi realizada incubando-se a mistura de reação (pH 7,5) em temperaturas que variaram de 30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C. Depois de 10 minutos de incubação em cada temperatura a atividade enzimática foi analisada, conforme item 3.7.

A estabilidade térmica foi avaliada incubando-se a enzima em temperaturas que variaram de 30 a 100 °C, com intervalos de 10 °C por duas horas. Após a incubação, a atividade residual foi analisada a temperatura ótima da enzima determinada anteriormente.

3.13.4. Efeito de íons metálicos e alguns compostos químicos na atividade da protease

Para estudar o efeito de diferentes íons metálicos e de alguns compostos químicos na atividade da protease, a enzima foi incubada a 60°C por 10 minutos, com o íon correspondente, nas concentrações de 1 e 10 mM. A atividade enzimática residual (%) foi determinada nas condições padrões anteriormente descritas. Um controle (ausência de metais) foi realizado e considerado como sendo 100% de atividade. Os compostos estudados foram: CaCl₂, KCl, urea, BaCl₂, AgNO₃, HgCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, CsCl, CoSO₄, NaSO₄, EDTA, NiCl₂, FeSO₄, acetato de cálcio, MnSO₄ e MgSO₄.

3.13.5. Estabilidade da enzima a diferentes temperaturas

O comportamento da protease a diferentes temperaturas e tempo de incubação foi investigado. Para tal a enzima foi incubada em banho-maria a temperaturas de 40, 60 e 90°C e a atividade determinada a cada 15 minutos durante 2 horas e 45 minutos conforme descrito anteriormente.

3.13.6. Efeito de Ca⁺² e Mn⁺² na estabilidade térmica da protease

O efeito dos íons Ca⁺² e Mn⁺² sobre a estabilidade térmica da enzima foi verificado incubando o extrato enzimático na presença de CaCl₂ (10mM) e MnSO₄ (10mM) nas temperaturas de 40, 60 e 90°C. Após intervalos de 15 minutos a atividade enzimática residual foi determinada nas condições pré-estabelecidas. Amostras controle foram avaliadas simultaneamente para todas as temperaturas, incubando-se o extrato na ausência dos metais.

3.13.7. Efeito do Ca⁺², Mn⁺² e da glicina na estabilidade térmica da protease

O extrato enzimático foi incubado a 60°C na presença de Ca⁺², Mn⁺², glicina, Ca⁺² + glicina e Mn⁺² + glicina. Um controle foi feito incubando a enzima a 60°C na ausência destes compostos. A intervalos de 15 minutos foram retiradas amostras para quantificação da atividade enzimática residual. As concentrações

de Ca^{+2} , Mn^{+2} e da glicina utilizadas foram 10mM, 10mM e 1mM, respectivamente.

3.13.8. Efeito de alguns agentes surfactantes e oxidantes na atividade da protease

Para determinação do efeito de agentes surfactantes e oxidantes na atividade da protease, o extrato enzimático foi pré incubado a 60°C por 15 e 30 minutos, em presença de Triton X-100 (1-5% v/v), SDS (0,1 a a 0,5%p/v), peróxido de hidrogênio (2,5 e 5,0 %v/v) e EDTA (1,2,5 e 10mM). Em seguida a atividade enzimática foi determinada conforme descrito previamente. Um controle, considerado como 100% foi feito incubando a enzima na ausência destes compostos nas mesmas condições anteriormente mencionadas.

3.13.9. Compatibilidade e estabilidade da protease em vários detergentes comerciais

Para avaliar a compatibilidade da enzima com detergentes comerciais foi realizada uma purificação da mesma pela sua precipitação com sulfato de amônio (Item 3.13.1).

Os detergentes Ariel[®], Ultra Biz[®], Cheer[®], Tide[®], Campeiro[®] e Omo[®] foram diluídos em água destilada a uma concentração final de 7mg/mL para simular condições de lavagem. Em seguida foram tratados termicamente a 100°C por 15 minutos para inativar as enzimas que poderiam fazer parte da formulação dos detergentes.

A protease, na concentração de 0,55mg/mL, foi adicionada na preparação do detergente e incubada a 60°C por 1h nesta solução. A cada 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade residual, tanto nos tratamentos quanto no controle (incubado sem nenhum detergente) (Banerjee et al., 1999; Phadataré et al., 1993). O detergente que possibilitou maior atividade da enzima foi utilizado em estudos subseqüentes.

3.13.10. Efeito do Ca^{+2} , Mn^{+2} e da glicina sobre a atividade e estabilidade da protease em detergentes comerciais

O detergente que possibilitou maior atividade enzimática foi diluído em água destilada para obter uma concentração de 7 mg/mL. Posteriormente foi tratado termicamente a 100°C por 15 min para inativar as enzimas que poderiam fazer parte de sua formulação. Após o resfriamento desta solução contendo o detergente, a enzima foi adicionada (0,55mg/mL) juntamente com um dos seguintes tratamentos: CaCl_2 (10mM), MnSO_4 (10mM), glicina (1mM), CaCl_2 (10mM) + glicina (1mM), MnSO_4 (10mM) + glicina (1mM). Os frascos foram incubados a 60°C e em intervalos de 10 minutos amostras foram retiradas para determinação da atividade residual que foi comparada com o controle realizado na ausência do detergente.

3.14. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp.

3.14.1. Utilização de soro de leite e água de maceração de milho

As fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio 3 (item 3.3) foram substituídas por soro de leite (0,1%) e água de maceração de milho 50% (corn steep liquor, Sigma) (0,5%).

Este meio foi inoculado com o microrganismo e uma curva de crescimento e produção enzimática foi construída durante 30 horas de incubação, retirando-se amostras a cada 4 horas.

Após definida a melhor concentração de soro de leite (0,1%) requerida para o crescimento e atividade proteásica, as fontes de carbono e nitrogênio do meio original foram substituídas por soro de leite e água de maceração de milho (0,5%), visando estudar mais detalhadamente o efeito simultâneo desses dois compostos. Realizou-se uma curva de crescimento e produção enzimática por 60 horas, retirando-se amostras a cada 4 horas.

A concentração da água de maceração de milho foi ajustada de modo que sua coloração escura não dificultasse a leitura da densidade ótica usada para determinação do crescimento microbiano.

A composição do concentrado protéico do soro é a seguinte: 70% de proteína, 3% de umidade, 15% de lactose, 2% de gordura e 10% de sais minerais.

3.14.2. Efeito da temperatura na atividade e estabilidade enzimática

O efeito da temperatura na atividade da enzima produzida em resíduos agroindustriais foi avaliado determinando-se a atividade enzimática nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C. A estabilidade térmica da enzima foi avaliada incubando-se o extrato enzimático nas mesmas temperaturas por 1 hora, em presença e ausência de CaCl_2 , seguidas da determinação da atividade enzimática a 60°C, conforme descrito anteriormente.

3.14.3. Efeito do pH na atividade e estabilidade enzimática

A influência do pH sobre a atividade da protease produzida em resíduos agroindustriais foi avaliada na faixa de 5,0 a 9,0 com intervalo de 0,5 unidade. Para o preparo do substrato foi utilizado uma mistura tamponante contendo tampão acetato de sódio, pH 5,0 e 5,5; fosfato de sódio, pH 6,0-8,0 e tampão Tris/HCl, pH 8,5 e 9,0. Os valores de pH da mistura de reação foram ajustados com NaOH ou HCl 1N.

O pH ótimo foi determinado preparando-se o substrato (azocaseína 0,2%) nas soluções tampão com diferentes valores de pH e incubando o mesmo com 0,5 mL do extrato enzimático em banho-maria a 50°C por 10 minutos. A atividade enzimática foi determinada conforme item 3.7.

A estabilidade da protease em diferentes valores de pH foi avaliada incubando-se o extrato enzimático sem substrato, nos tampões anteriormente descritos, por 2 horas à temperatura ambiente. Após este tratamento, a atividade residual da protease foi determinada conforme descrito no item 3.7.

3.14.4. Atividade enzimática em detergentes comerciais da protease produzida em resíduos agroindustriais

O microrganismo foi cultivado no Meio 3 contendo 0,1% de soro de leite e 0,5% de água de maceração de milho a 50° C. Após 36 horas de crescimento, as células foram separadas por centrifugação (Hermle Z 382K) a 4500g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante (extrato livre de células) utilizado para o estudo da estabilidade enzimática em detergentes comerciais.

Os detergentes Ariel[®], Ultra Biz[®], Cheer[®], Tide[®] e Omo[®] foram tratados termicamente a 100°C por 15 minutos e preparados em uma concentração de 7mg/mL de extrato enzimático. Para cada amostra de detergente foram realizados 4 tratamentos:

- **Tratamento 1:** detergente + enzima + CaCl₂ (10mM) + glicina (1mM);
- **Tratamento 2:** detergente + enzima + CaCl₂ (10mM);
- **Tratamento 3:** detergente + enzima;
- **Tratamento 4:** apenas a enzima (controle).

Todos os tratamentos foram submetidos à incubação a 70°C por 1 hora. A cada 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade residual, que foi comparada com o controle, realizado sem a adição de detergentes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência da composição do meio de cultura sobre o crescimento do microrganismo e a atividade proteásica

4.1.1. Efeito da fonte de carbono

A influência da substituição do glicerol no Meio 1 por outras fontes de carbono, sobre o crescimento do microrganismo e a atividade da protease, é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1 - Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 após 9 horas de incubação a 50 °C e pH inicial de 7,0, usando diferentes fontes de carbono.

Fontes de Carbono	Crescimento (DO _{470nm})	Atividade Enzimática (U/mgProteína)
Glicerol	0,93	0,36
Galactose	0,34	0,25
Lactose	0,39	0,37
Sacarose	0,67	0,76
Maltose	0,24	0,45
Amido	1,24	1,14
Glicose	0,50	0,53
Manose	0,74	0,74
Arabinose	0,41	0,15
Caseína	0,41	0,33
Xilose	0,33	0,29
Frutose	0,51	0,22
Citrato Trissódico	0,99	1,11
Ácido cítrico	0,45	0,79

As fontes de carbono foram usadas na concentração de 1%

O microrganismo foi capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono para a síntese da protease. Entretanto, os compostos que possibilitaram maior atividade enzimática foram o amido e o citrato trissódico com níveis de atividade de 1,14U/mgPtn e 1,11U/mgPtn respectivamente.

De acordo com os resultados mostrados, quando estes compostos foram utilizados, houve um aumento de cerca de três vezes na atividade da enzima, quando comparado com o meio contendo glicerol. Outras fontes como o ácido cítrico, manose e sacarose possibilitaram um aumento de aproximadamente 2 vezes na produção de protease, comparado com o meio basal contendo glicerol. Portanto o amido e o citrato trissódico podem ser consideradas como boas fontes de carbono para a produção de proteases pelo *Bacillus* sp. espécie SMIA-2. Por outro lado, fontes de carbono como lactose, galactose, arabinose, xilose e frutose inibiram não só o crescimento do microrganismo, como também a síntese da protease.

Em um estudo similar, Johnvesly and Naik (2001) também encontraram como melhores fontes de carbono para a produção de proteases por *Bacillus* sp. JB-99, o ácido cítrico, amido solúvel e citrato trissódico. Joo et al (2002) encontraram um aumento de aproximadamente 15% na atividade enzimática, quando citrato de sódio foi utilizado para a produção de protease e uma redução

de 45% na atividade enzimática quando glicose (1%) foi utilizada no meio de cultura. De acordo com os autores amido e citrato trissódico são fontes baratas de carbono, com elevado potencial para a produção de proteases.

Não foi verificado efeito inibitório ocasionado pela utilização de glicose, fato esse bastante discutido por outros pesquisadores. No presente estudo a glicose foi uma fonte relativamente boa para a produção de proteases.

Em alguns trabalhos, como o realizado por Singh et al. (1994), a glicose foi considerada a melhor fonte de carbono para a produção de protease por *Aspergillus niger*. Entretanto existem muitos dados indicando efeito inibitório causado pelo uso de glicose como fonte de carbono. Gibb et al (1989) verificaram que uma concentração elevada de glicose e de extrato de levedura resultaram em um excelente meio de crescimento, mas prejudicaram a produção de protease. Elevada produção da enzima foi encontrada utilizando-se baixos níveis de glicose e de extrato de levedura.

Algumas pesquisas têm demonstrado que bioprodutos ácidos produzidos por *Bacillus* sp. em presença de excesso de glicose, promovem uma elevada inibição no crescimento das células, além de afetarem vários fatores importantes como produção celular, estabilidade e rendimento produtivo (Feng et al. 2001).

De acordo com Priest (1977), a síntese de protease em *B. licheniformis*, *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* pode ser reprimida por glicose, porém, o acúmulo de exoenzimas no meio de cultura em presença deste composto, indica que a repressão catabólica não é um fenômeno geral e que elevados níveis de exoenzimas podem ser produzidos quando glicose é a principal fonte de carbono.

4.1.2. Efeito da fonte de nitrogênio

Muitos organismos utilizam o nitrogênio (tanto orgânico quanto inorgânico) para produzir, principalmente, aminoácidos, ácidos nucleicos, proteínas e componentes de parede. A produção de proteases pelos microrganismos depende da disponibilidade da fonte de carbono e também da de nitrogênio no meio de cultura. O tipo da fonte de nitrogênio também afeta a produção de enzimas e para estudar este efeito, a fonte de nitrogênio, tanto orgânica quanto inorgânica, do meio de cultura foi variada.

De acordo com os resultados mostrados na Tabela 2, foi observado que dentre as várias fontes de nitrogênio estudadas, a máxima atividade da protease (1,1U/mg Ptn), foi alcançada quando o nitrato de amônio (NH_4NO_3) foi utilizado no meio de cultura. Isto corresponde a um aumento de aproximadamente 5 vezes na atividade enzimática, quando comparado com o meio inicial que continha 0,45% de peptona como fonte de nitrogênio. Resultados satisfatórios foram também encontrados quando as fontes inorgânicas de nitrogênio, cloreto de amônio (NH_4Cl), citrato de amônio e nitrato de potássio (KNO_3) foram utilizadas.

De uma forma geral, as fontes orgânicas de nitrogênio estimularam mais o crescimento do microrganismo que as inorgânicas, porém, em termos de atividade enzimática as fontes inorgânicas possibilitaram maior produção da protease pelo *Bacillus* sp. SMIA-2.

Sinha e Satyanarayana (1991) também encontraram elevada produção de protease quando fontes inorgânicas de nitrogênio, como sulfato de amônio e nitrato de amônio, foram utilizadas no meio de cultura.

Ferrero et al. (1996) encontraram um aumento de cerca de 45% na produção de protease quando nitrato de amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio no meio de cultura. De acordo com estes autores, as fontes orgânicas de nitrogênio reduziram a produção enzimática em aproximadamente 80 a 90%.

O aumento da concentração da peptona no meio de cultura resultou em um aumento do crescimento do microrganismo, sem afetar a produção enzimática até uma concentração de 0,2%. Concentrações de peptona superiores a 0,2% inibiram a atividade da protease produzida por este microrganismo. O aumento de 0,2% para 0,3% de peptona no meio de cultura resultou em uma redução de aproximadamente 32,56% na atividade da protease.

Em um estudo realizado por Banerjee et al. (1999), a peptona foi a pior fonte de nitrogênio utilizada para a produção de protease por *Bacillus brevis*. Jonvesly e Naik (2001) relataram que as fontes inorgânicas de nitrogênio, como o nitrato de sódio e de potássio, foram as mais eficientes para a produção de proteases por *Bacillus* sp. JB-99. Segundo estes autores, a presença da peptona e do extrato de levedura e de carne inibiram a síntese da enzima.

Tabela 2 - Crescimento e atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado a 50 °C por 9 horas em diferentes fontes de nitrogênio.

Fontes de Nitrogênio	Crescimento (DO _{470nm})	Atividade Enzimática (U/mgProtein)
Sem nitrogênio	0,25	0,27
Peptona (0,1%)	0,60	0,28
Peptona (0,2%)	1,10	0,43
Peptona (0,3%)	1,55	0,29
Peptona (0,5%)	1,49	0,22
Peptona (1,0%)	1,46	0,05
Extrato de Levedura	1,41	0,13
Extrato de Carne	1,82	n.d.
Caseína	0,63	0,10
Citrato de Amônio	0,57	0,73
NH ₄ NO ₃	0,64	1,10
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,41	0,18
NH ₄ Cl	1,00	0,76
KNO ₃	0,55	0,59
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,24	0,16

As fontes de nitrogênio foram usadas na concentração de 1%, exceto quando mencionado.

Estudos conduzidos por vários outros pesquisadores revelaram que as fontes orgânicas de nitrogênio foram as melhores para o crescimento e produção de protease por alguns microrganismos (Aleksieva et al. 1981; Phadatare et al. 1993).

De um modo geral, na produção em larga escala, não somente a fonte de nitrogênio, mas o preço da mesma deve ser considerado na seleção da melhor fonte e por isso, de acordo com Anwar e Saleemuddin (1998), os sais de amônio são os preferidos para produção industrial de proteases, devido ao custo envolvido no processo.

4.1.3. Efeito da suplementação do meio de cultura com metais

O crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e a atividade da protease em função do tempo de fermentação, foram observados por 12 horas em meio líquido contendo 1% de citrato trissódico como fonte de carbono e 1% de nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Figura 3a). O crescimento foi iniciado imediatamente após a incubação do meio de cultura. Entretanto, a secreção da protease foi iniciada somente após 5 horas de crescimento. De acordo com Singh

et al. (2003), essa produção enzimática depois de determinado tempo de crescimento, pode estar relacionada à necessidade de uma massa mínima de células, para que o microrganismo consiga sintetizar suas enzimas.

O crescimento exponencial do microrganismo foi observado por um período de tempo relativamente curto, de 5 horas, iniciando após 2 horas de crescimento e finalizando após 7 horas. A partir deste tempo, a velocidade do crescimento foi reduzida e a cultura entrou na fase estacionária.

A produção enzimática aumentou no final da fase exponencial e início da fase estacionária de crescimento. A atividade máxima da protease foi alcançada após 9 horas de incubação do microrganismo, com níveis de 1,93U/mg de proteína, quando o crescimento já havia sido cessado e a cultura se encontrava na fase estacionária. Durante esta fase, quando a cultura já havia alcançado a máxima produtividade enzimática, a atividade da protease foi reduzida, o que sugere que a produção da enzima está associado ao crescimento e que a mesma foi produzida, quando a cultura estava metabolicamente ativa.

De acordo com Ward, 1985, os microrganismos do gênero *Bacillus* geralmente produzem maior quantidade de protease ao final da fase exponencial de crescimento. A função destas enzimas ainda não é bem conhecida, mas sua produção está correlacionada com uma elevada taxa de renovação de proteínas durante a esporulação.

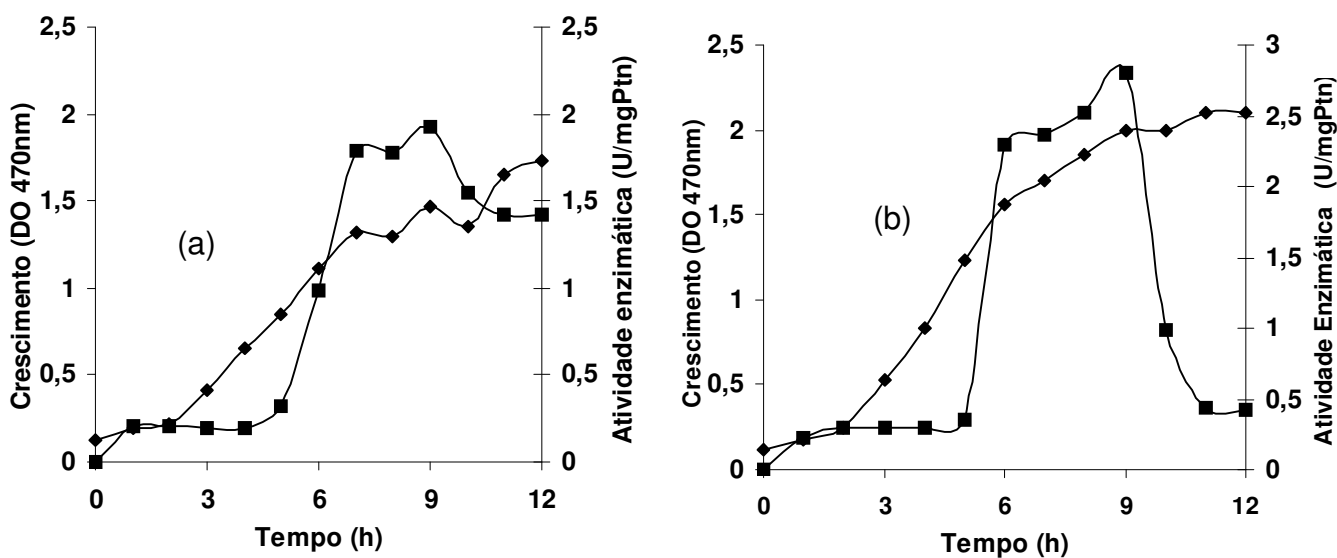


Figura 3 - Crescimento (●) e produção de protease (●) em função do período de crescimento de *Bacillus* sp. SMIA-2 em meio de cultura contendo citrato trissódico como fonte de carbono e nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (a) e suplementado com traços de metais (b).

Como a síntese de proteases está intimamente ligada ao processo de esporulação, fatores que afetam a esporulação como condições de stress, seja pela redução da concentração de nutrientes, tensão de oxigênio ou composição do meio, podem ter um profundo efeito na produção destas enzimas (Ming Chu et al. 1992).

A Figura 3b mostra que a suplementação do meio de cultura com uma solução de traços de metais, promoveu um aumento no crescimento do microrganismo e na secreção da protease. A atividade máxima desta enzima no meio contendo metais foi aproximadamente 45% maior que a encontrada no meio de crescimento sem adição destes compostos. Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores como Ferrero et al., 1996 que observaram que o uso de citrato trissódico juntamente com $MgSO_4$, $CaCl_2$, $MnSO_4$ e $ZnSO_4$ favoreceu a produção de protease por *Bacillus licheniformis* MIR 29. Segundo, Tortora et al. (2002), pequenas quantidades de elementos traços como ferro, cobre, molibidênio e zinco são necessários para o crescimento microbiano uma vez que participam como cofatores essenciais para a atividade de algumas enzimas sendo necessário em alguns casos, adicioná-los ao meio de crescimento

O microrganismo apresentou um comportamento similar aquele encontrado quando cultivado no meio de cultura sem a presença dos traços de metais, ou seja, uma fase exponencial relativamente curta com a fase estacionária sendo alcançada após 9 horas de incubação. A densidade ótica máxima de crescimento, no entanto, foi de 2,1 enquanto que no experimento anterior, realizado sem metais, foi de 1,4. A produção enzimática teve início após 5 horas de incubação e foi aumentando com o crescimento microbiano, atingindo valor máximo após 9 horas de crescimento, com níveis de 2,8U/mg de proteína. Após este período a atividade decresceu drasticamente, atingindo cerca de 1/3 da atividade máxima, em 10 horas de crescimento. Embora a adição da solução de traços de metais ao meio de cultura tenha aumentado o crescimento do *Bacillus* sp. SMIA-2 e sua produção enzimática, um decréscimo mais acentuado na atividade desta enzima foi observado na fase estacionária da cultura. Estes resultados indicam que tal comportamento da protease não é desejável, uma vez que poderia comprometer a sua produção em larga escala, já que o período em que a protease permanece com sua atividade ideal, é bastante curto.

4.1.4. Influência da presença do K_2HPO_4 e do $CaCl_2$ no meio de cultura, sobre o crescimento e a atividade da protease

O crescimento e a atividade da protease de *Bacillus* sp. SMIA-2 cultivado por 9 horas no em meio líquido contendo 1% de citrato trissódico e 1% de nitrato de amônio estão mostrados na Figura 4a. Como já discutido anteriormente, após a atividade da enzima ter alcançado o valor máximo, que ocorreu com 9 horas de crescimento, ocorreu uma queda rápida da sua atividade. Portanto, após alcançar seu pico, a enzima sofre um rápido processo de desativação.

Esse rápido processo de desativação torna difícil a produção enzimática em larga escala, devido a dificuldade de se isolar a enzima em sua atividade máxima. Portanto, é necessário identificar caminhos que aumentem a estabilidade da enzima. Isto pode ser conseguido através de modificações do meio de crescimento. Estas modificações, contudo, não podem prejudicar o crescimento do microrganismo.

Como já foi demonstrado por muitos pesquisadores (Bakhtiar et al, 2002; Ghorbel et al., 2003; Azeredo, 2004), o íon cálcio possui importante efeito estabilizador de proteases. Neste sentido, o meio de crescimento contendo 11mM K_2HPO_4 de foi suplementado com 0,2,mM de $CaCl_2$ (Figura 4b).

Essa modificação não proporcionou um aumento da atividade enzimática, porém a estabilidade da enzima foi prolongada de 2 para 4 horas, sendo possível constatar o importante papel do cálcio na estabilidade da protease. Posteriormente, a concentração do cálcio no meio de cultura foi aumentada para 2 mM (Figura 4c). Esta nova composição do meio de cultura também não ocasionou um aumento na atividade enzimática, mas melhorou a estabilidade da protease, quando comparado com a curva da Figura 4b.

Uma outra modificação do meio de cultura foi também realizada. Como já descrito anteriormente, o meio de cultura utilizado para o crescimento do microrganismo, continha 11mM de fosfato de potássio. Esta concentração foi reduzida para 5mM e a concentração do cálcio mantida em 2mM. Esta modificação promoveu um acréscimo de 82,29% na atividade da protease, que era inicialmente de 7,2 U/mL e passou para 13,12U/mL (Figura 4d). Além do aumento da atividade da protease, a enzima manteve-se estável por um período de 3 horas, o que é de grande importância para a sua produção em larga escala.

Esses resultados são similares aqueles encontrados por Jansen et al.(1994) que mostraram que a remoção de agentes quelantes , a substituição de fosfato inorgânico por ô-glicerofosfato de sódio e o aumento da concentração de cálcio no meio de crescimento, aumentou a atividade da protease produzida por *Thermus* sp.. De acordo com estes autores, o aumento na atividade da protease se deve ao aumento de cálcio disponível para o crescimento microbiano.

De acordo com Kumar e Takagi (2001), fosfato de potássio tem sido utilizado como fonte de fosfato em vários estudos e tem se mostrado responsável pela capacidade tamponante do meio de cultura. Porém um excesso deste componente foi relacionado com uma redução do crescimento da cultura e da produção enzimática. Elevadas concentrações podem ocasionar uma precipitação do meio de cultura durante o processo de esterilização em autoclave, reduzindo as concentrações de metais disponíveis para o crescimento do microrganismo.

O cálcio solúvel como o cloreto de cálcio e acetato de cálcio, são precipitados quando uma elevada concentração de fosfato é utilizada no meio de fermentação e assim os produtos de síntese, como as enzimas, são altamente inibidos por este composto (Rinker et al., 1999).

O fosfato possui um papel vital como um promotor de grande número de reações enzimáticas de metabolismo primário, incluindo a síntese de DNA, RNA e proteínas, metabolismo de carboidratos, respiração celular e controle dos níveis de ATP. É muito utilizado por componentes celulares como ATP, coenzimas, ácidos nucleicos, fosfolipídeos e polímeros da parede celular. O excesso de fosfato inorgânico, até certos níveis, tem sido relacionado com o aumento do consumo de glicose, crescimento celular e produção de enzimas em microrganismos selvagens e recombinantes.

De acordo com Moon e Parulekar (1992), a produção de protease foi limitada pela concentração reduzida de fosfato, provavelmente por prejudicar a utilização de carbono, o que leva a uma redução de quantidade de α -amilase e protease. Porém, esse aumento da concentração de fosfato é limitado, existindo uma concentração ótima para o favorecimento da síntese de enzimas. Em um experimento realizado por estes autores, a produção de protease por *B. firmus* foi reduzida quando níveis maiores que 23mM foram adicionados ao meio de cultura.

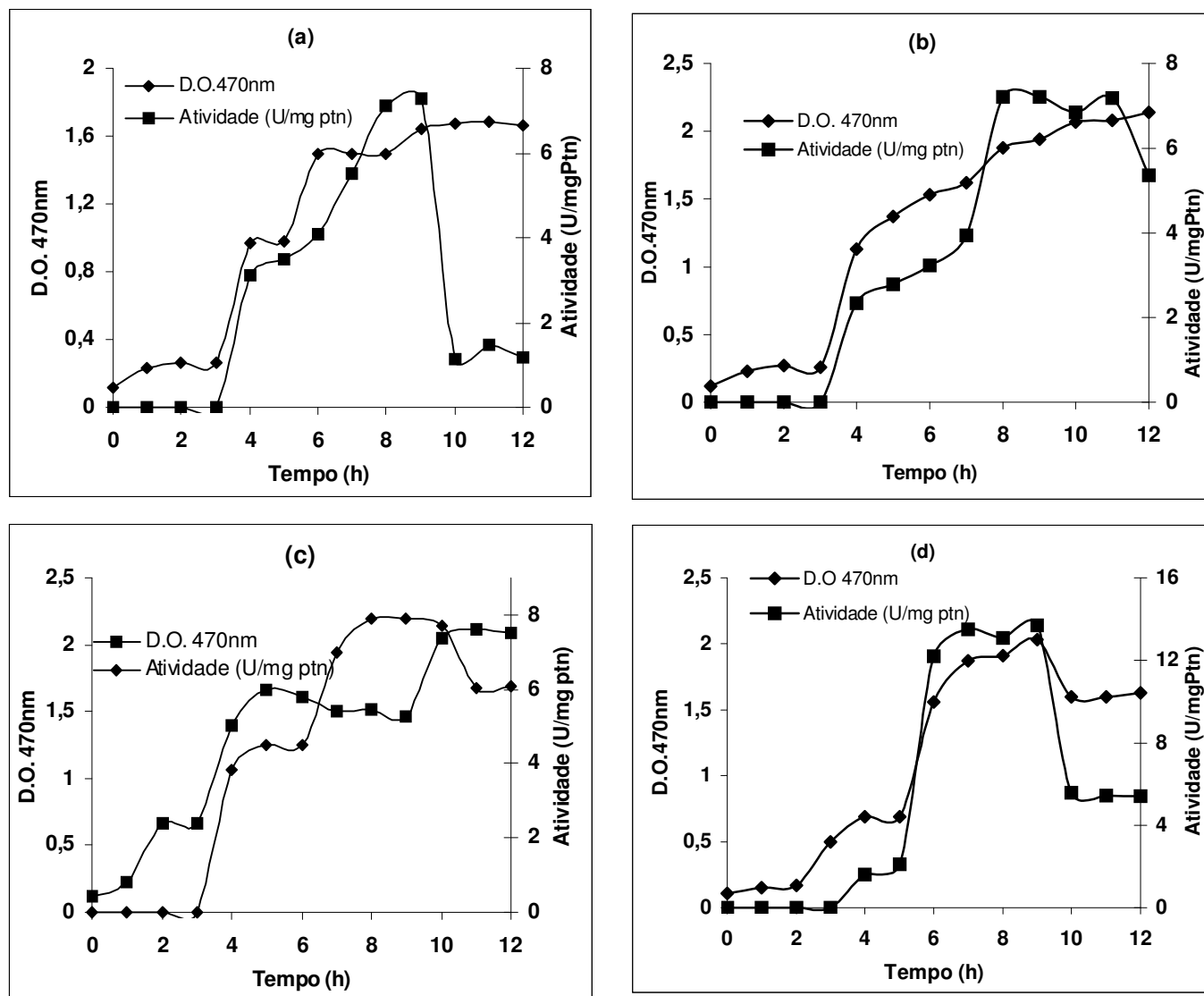


Figura 4 – Curva de crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C em meio líquido contendo citrato trissódico (1%) como fonte de carbono e nitrato de amônio (1%) como fonte de nitrogênio. (a) meio contendo 11mM de fosfato de potássio; (b) meio contendo 11mM de fosfato de potássio e 0,2mM de CaCl₂; (c) meio contendo 11 mM de fosfato de potássio e 2 mM CaCl₂; (d) meio contendo 5mM de fosfato de potássio e 2 mM de CaCl₂.

4.1.5. Efeito da concentração do citrato trissódico

Dentre os vários fatores que afetam o crescimento e a produção de enzimas por microrganismos destaca-se a concentração da fonte de carbono. Por isso foi realizada uma investigação para determinar qual a melhor concentração do citrato trissódico para a secreção da protease pelo microrganismo em estudo.

O aumento da concentração do citrato trissódico de 0,75% para 1,5% aumentou o crescimento e a atividade da protease. Em concentrações mais elevadas da fonte de carbono, a produção da enzima foi comparativamente maior e o tempo requerido para a produção da enzima foi praticamente o mesmo (Figura 5). Assim, a concentração de 1,5% foi estabelecida como a melhor para a secreção da protease por *Bacillus* sp. SMIA-2.

As medidas de crescimento, atividade enzimática e pH do meio de crescimento contendo 1,5% de citrato trissódico são mostradas na Figura 6. O pH do meio decresceu ligeiramente com o início do crescimento microbiano, mas aumentou novamente com o início da produção enzimática.

De acordo com Ming Chu (1992), durante o crescimento da cultura, a acidificação ou alcalinização do meio, reflete o consumo de substrato. Quando íons amônio estão sendo utilizados, o meio torna-se mais ácido e quando nitrogênio orgânico (aminoácidos e peptídeos) está sendo assimilado, o meio torna-se mais alcalino. Devido a essa relação entre a síntese de protease e a utilização de compostos nitrogenados, a variação do pH é utilizada para fornecer informações importantes sobre a produção de proteases, como o início e o final de sua síntese.

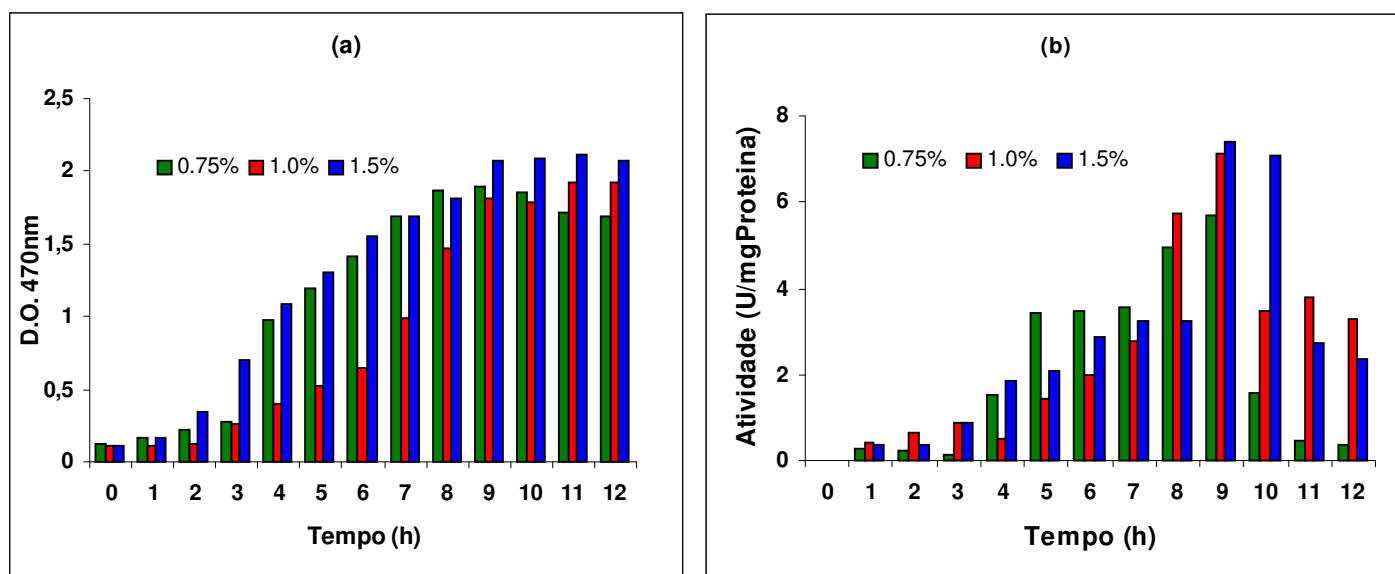


Figura 5 – Efeito da concentração de citrato trissódico no crescimento (a) e atividade enzimática (b) de *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50°C.

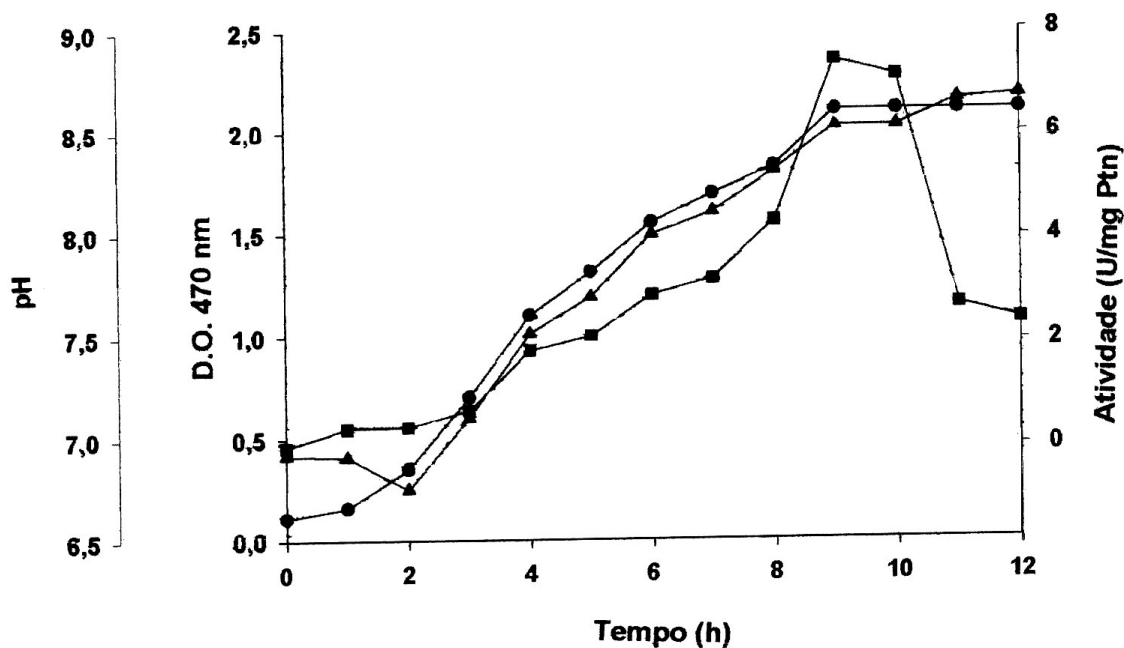


Figura 6 - Curva de crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C no meio líquido contendo 1,5% de citrato trissódico como fonte de carbono: (● crescimento; ▲ atividade enzimática; ■ pH).

4.1.6. Efeito da concentração de nitrato de amônio

A concentração do nitrato de amônio foi variada no meio basal, para avaliar seu efeito no crescimento e na atividade da protease. Foram estudadas concentrações de 20mM, 50mM e 125mM e os resultados encontrados estão mostrados na Figura 7.

Quando maiores concentrações de nitrato de amônio foram adicionadas ao meio de cultura foi observado que a atividade da protease diminuiu. A melhor concentração deste componente no meio de cultura para crescimento do microrganismo e secreção da protease foi 50mM.

Embora o amônio tenha sido considerado a melhor fonte de nitrogênio para a produção de protease por várias bactérias, o seu excesso no meio de cultura pode ser considerado como um forte repressor na síntese enzimática.

Em culturas de *Bacillus subtilis* a formação de proteases foi reduzida quando concentrações maiores que 50mM de nitrato de amônio foram utilizadas no meio de cultura. Por outro lado, o crescimento do microrganismo foi praticamente o mesmo (Chu *et al.*, 1992).

Em um trabalho realizado por Moon e Parulekar (1992) foi observado que o aumento na concentração de amônio de 56,1mM para 74,8mM, aumentou a síntese enzimática, porém níveis maiores que 74,8mM, resultaram em inibição da produção enzimática.

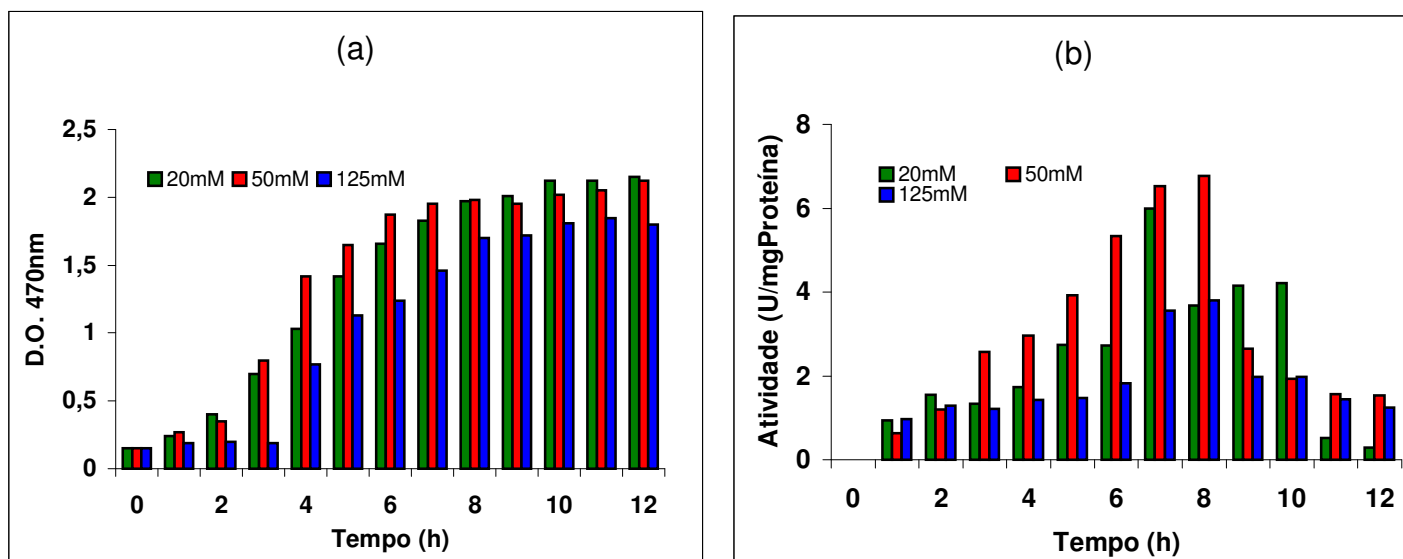


Figura 7 - Efeito da concentração de nitrato de amônio no crescimento (a) e produção de protease (b) *Bacillus sp.* espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C.

4.2. Caracterização parcial da protease

4.2.1. Efeito do pH na atividade e estabilidade da protease

Um aumento da atividade da protease foi observado a partir de valores de pH acima de 7,0, alcançando o seu valor máximo em pH 8,0. Posteriormente, a atividade reduziu. A pH 8,5 a enzima perdeu 27% de sua atividade original e em pH 9,0 esta perda foi de 67% (Figura 8).

Resultados semelhantes relacionados ao pH ótimo de proteases foram encontrados por vários autores para diferentes microrganismos estudados. Sookkheo *et al.* (2000) encontraram valores de pH ótimo de 8,5; 7,5 e 7,0 para três proteases (S,N e B respectivamente) de *Bacillus stearothermophilus* TLS33.

A protease S foi ativa em uma ampla faixa de pH sendo detectado cerca de 60% de atividade em pH 6 e 10, na presença de 5mM de CaCl₂. Por outro lado, as protease N e B mantiveram relativamente pouca atividade em pH 9,0.

Kim et al. (2002) encontraram para a protease produzida por *Bacillus stearothermophilus*, valor de pH ótimo igual a 7,5, enquanto Germano et al. (2003) encontraram um pH ótimo para protease produzida por *Penicillium* sp na faixa de 6,0 a 8,0.

De acordo com Beg e Grupta (2003) geralmente as proteases comerciais de origem microbiana 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.

Em relação a estabilidade da protease, o extrato enzimático sem o substrato foi incubado em soluções tampão a vários valores de pH (5,5 – 9,0) por 2 horas à temperatura ambiente. Em seguida a atividade enzimática foi determinada usando-se o substrato preparado no pH ótimo e à temperatura de 50°C.

A estabilidade da protease aumentou a medida que os valores do pH também aumentaram, sendo que em pH 8,0 a enzima manteve 81% de sua atividade após 2 horas de incubação. Já em pH 9 cerca de 67% da atividade enzimática foi perdida (Figura 8).

Ghorbel et al (2003) encontraram valores semelhantes de estabilidade térmica para proteases de *Bacillus cereus* BG1, cuja estabilidade máxima foi alcançada em pH 8,0, com valores de aproximadamente 90% de atividade. Por outro lado, Fahmy et al. (2004) encontraram pH ótimo igual a 4,0 para protease produzida por *Triticum aestivum*.

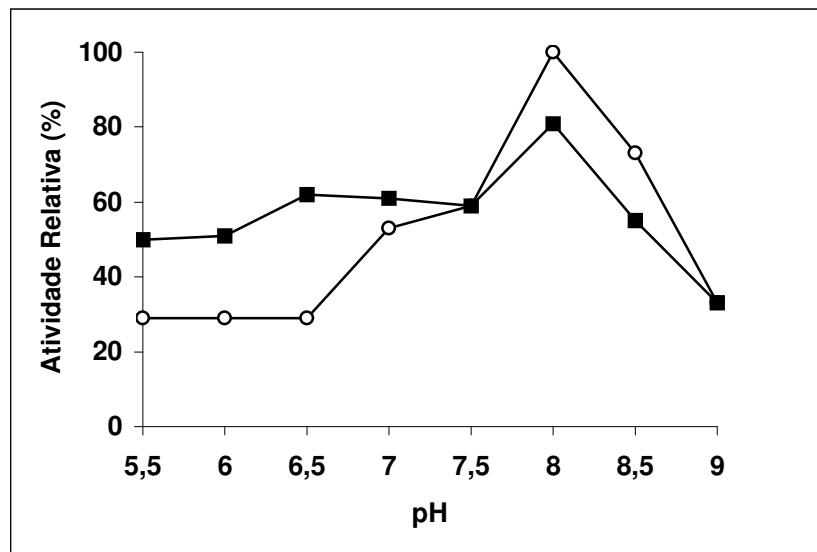


Figura 8 - pH ótimo (○) e estabilidade (—) de protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50 °C por 9h. O pH ótimo foi determinado medindo-se a atividade enzimática em substrato preparado em diferentes valores de pH. A estabilidade ao pH foi determinada incubando-se a protease por 2 horas nos diferentes valores de pH. (100% atividade enzimática = 0.8 U/mg Proteína).

4.2.2. Determinação da temperatura ótima e estabilidade térmica da protease

A temperatura ótima da protease foi determinada medindo-se a atividade desta enzima em temperaturas variando de 30 a 100°C e a pH 8,0.

De acordo com os resultados encontrados (Figura 9), a atividade enzimática aumentou com o aumento da temperatura na faixa de 30 a 60°C. A temperatura ótima da protease foi de 60°C, apresentando porém, uma atividade próxima da ótima a 50°C. A partir desta temperatura, a atividade reduziu, sendo encontrado 31% e 11% de atividade a 90°C e 100°C respectivamente.

Fahmy et al. (2004) encontraram resultados semelhantes para proteases produzidas por *Triticum aestivum* onde foi verificada temperatura ótima de 50°C. Uma protease produzida por *Streptomyces* sp. apresentou temperatura ótima entre 55 e 70°C (Azeredo et al, 2004) e outra produzida por *B. licheniformis* MIR 29 também apresentou temperatura ótima de 60°C

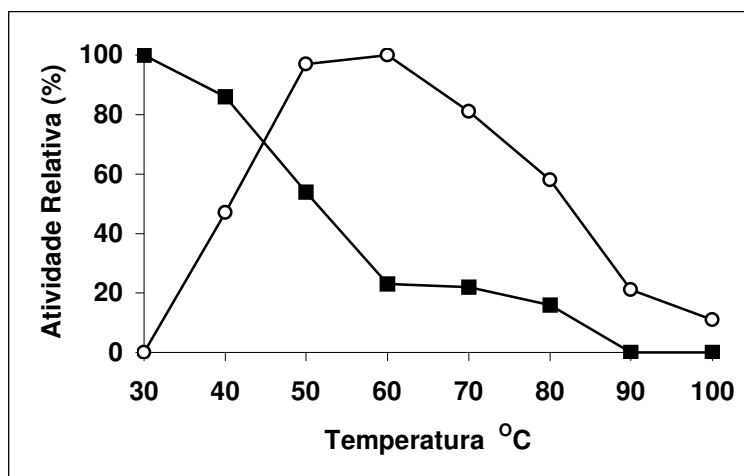


Figura 9 - Temperatura ótima (o) e estabilidade (—) de protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2 crescido a 50 °C por 9h. Temperatura ótima determinada medindo-se a atividade enzimática nas diferentes temperaturas. Estabilidade térmica determinada após incubação da protease por 1 hora nas diferentes temperaturas. (100% de atividade enzimática = 0.6 U/mg Proteína).

A termoestabilidade da protease foi determinada incubando-se a enzima na ausência de substrato, nas temperaturas de 30°C a 90°C por 2 horas e medindo-se a atividade residual a 60°C.

A enzima manteve 86% de sua atividade quando incubada a 40°C e reduziu sua estabilidade com o aumento da temperatura. Quando mantida por 2 horas a 50 e 60°C a enzima perdeu 46 e 77% de sua atividade respectivamente. A incubação da enzima a 90 e 100°C por 2 horas resultou na completa inibição da atividade desta enzima.

A protease produzida por *Bacillus* sp. JB-99 manteve cerca de 63% e 25% de sua atividade original após 1h de tratamento térmico a 70 e 80°C. Porém em presença de 10mM de Ca⁺⁺ a enzima tornou-se mais estável, mantendo cerca de 83% e 74% de sua atividade inicial, respectivamente (Johnvesly e Naik,2001).

O interesse por proteínas termoestáveis produzidas especialmente por microrganismos termofílicos e hipertermofílicos, que crescem na faixa de temperatura entre 45 e 110°C, tem crescido a cada dia. Esta estabilidade é considerada como a preservação da estrutura tridimensional sobre diferentes condições físicas ou químicas. A funcionalidade da proteína é completamente dependente de seu estado nativo que também pode variar devido a presença de substratos e ou cofatores (Scandurra et al., 1998).

A estabilidade de proteases é medida em termos da inativação enzimática ao longo do tempo. Porém, esta inativação pode ocorrer por diferentes caminhos, como autólise, agregação, oxidação e desnaturação e por isso não existe um modelo plausível para representar a cinética de degradação em todas as possibilidades (Stoner et al., 2004).

4.2.3. Efeito de íons metálicos na atividade da protease

O efeito de diferentes íons metálicos e de alguns compostos químicos na atividade da protease foi determinado incubando-se a enzima a 60°C/10 minutos na presença do respectivo composto nas concentrações de 1 e 10mM, seguido da determinação da atividade enzimática residual (%) na mesma temperatura. Um controle, conduzido na ausência dos metais, foi também feito e considerado como sendo 100% da atividade da enzima.

Como mostrado na Tabela 3, os íons metálicos CaCl₂, AgNO₃, ZnSO₄, NaSO₄, FeSO₄, acetato de cálcio, MnSO₄ e MgSO₄ estimularam a atividade enzimática. Alguns, em ambas as concentrações estudadas e outros, em apenas uma delas. A atividade enzimática também foi estimulada na presença de uréia.

De acordo como Tomazic (1991) a estabilização de algumas enzimas pode ser induzida por aditivos não protéicos, principalmente íons bivalentes como Ca⁺², Mn⁺², Zn⁺² e Mg⁺². Esses íons, usados em baixas concentrações, podem estabilizar a estrutura terciária da proteína promovendo a formação de ligações cruzadas, que conferem a ela uma maior estabilidade.

Trabalhos realizados no campo da tecnologia enzimática sobre o efeito de metais na atividade de enzimas são encontrados com muita freqüência na literatura. Jonvesly e Naik (2001) observaram que a protease produzida por *Bacillus* sp. JB-99 foi estimulada na presença de Ca⁺², Mn⁺² e Mg⁺². Proteases de *Bacillus brevis* também foram estimuladas por acetato de cálcio, CaCl₂ e MnSO₄. Além disso, estes autores verificaram que estes íons foram essenciais para o crescimento do microrganismo.

Ainda com relação aos resultados apresentados na Tabela 3, foi verificado que alguns íons como KCl, HgCl₂, CuSO₄, CsCl e CoSO₄ inibiram a atividade da protease. Em presença de 10mM de HgCl₂ a enzima foi

completamente inibida. Vários autores também encontraram um efeito inibitório do HgCl_2 sobre a atividade de proteases (Jonvesly et al. 2002; Beg e Gupta, 2003).

Ghorbel et al. (2003) estudando o efeito de metais sobre a atividade da protease produzida por *Bacillus cereus* BG1, encontraram uma redução de 28 e 35% na atividade da enzima em presença de Zn e Cu respectivamente. Segundo estes autores, esses cátions podem reduzir a estabilidade enzimática por desestabilizar as cargas negativas, resultando em repulsão na molécula de proteína, o que pode acarretar em perda de atividade enzimática.

Tabela 3 – Efeito de alguns íons metálicos e compostos químicos na atividade da protease.

Metais	% Atividade Residual	
	Concentração	
	1mM	10mM
CaCl_2	148	150
KCl	0	29
Urea	129	202
BaCl_2	40	100
AgNO_3	129	52
HgCl_2	33	0
CuSO_4	40	64
ZnSO_4	36	109
CsCl	50	81
CoSO_4	0	45
NaSO_4	95	133
NiCl_2	111	50
FeSO_4	89	171
Acetato de Cálcio	179	100
MnSO_4	132	154
MgSO_4	118	161
Controle	100	100

A enzima foi pré-incubada com o íon metálico a 60°C por 10 minutos. A atividade é expressa como porcentagem da atividade obtida em ausência de metais. 100% de atividade = 1,91U/mg de proteína.

4.2.4. Influência da temperatura e do tempo de incubação sobre a atividade da protease

Para este estudo, a enzima foi incubada nas temperaturas de 40°C , 60°C e 90°C por 2 horas e 45 minutos e amostras foram retiradas a intervalos de 15 minutos para determinação da atividade enzimática residual.

A enzima reteve 85, 78 e 49% de sua atividade após 15 minutos a 40, 60 e 90°C respectivamente. Na temperatura de 90°C, a protease perdeu completamente a atividade após este período de tempo (Figura 10).

Quando incubada a 40°C, a enzima apresentou boa estabilidade, mantendo 76% de atividade residual por 75 minutos de incubação, enquanto que a 60°C, verificou-se uma redução linear da atividade entre 30 e 60 minutos de incubação. A completa inativação da enzima se deu após 135 minutos a 60°C e após 150 minutos a 40°C.

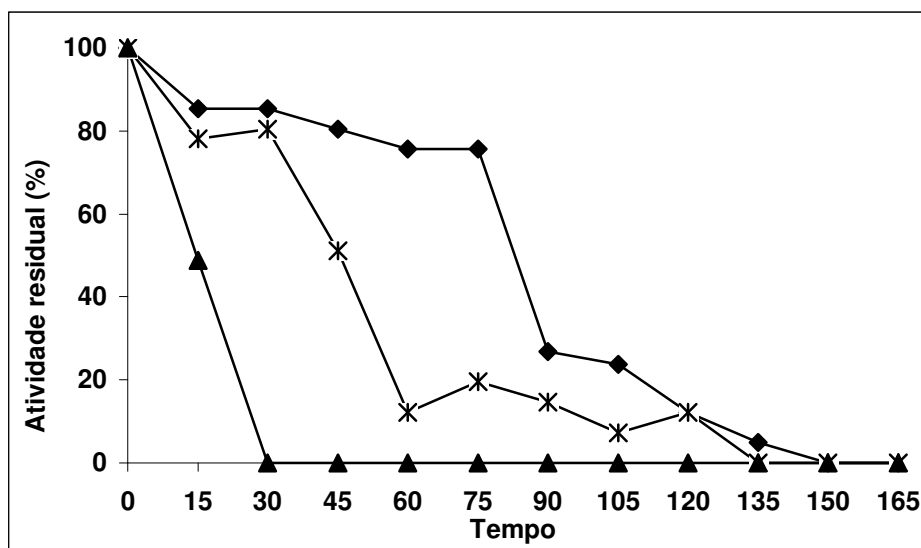


Figura 10 - Estabilidade térmica da protease nas temperaturas de 40°C (▲), 60 °C (*) e 90°C (●).

De acordo com Ghorbel et al., 2003, um dos fatores responsáveis pela rápida inativação térmica das enzimas é o aumento da relação de proteólise em temperaturas elevadas.

4.2.5. Influência do CaCl₂ e MnSO₄ na estabilidade térmica da protease

Vários trabalhos mostraram que os íons cálcio possuem um papel importante na estabilização das proteases em temperaturas elevadas. Assim uma investigação foi conduzida para avaliar o efeito deste íon e do manganês sobre a estabilidade da protease. Para tal, a enzima foi incubada na presença de CaCl₂ (10mM) e MnSO₄ (10mM) nas temperaturas de 40, 60 e 90°C por 2 horas e 45

minutos e amostras foram retiradas a intervalos de 15 minutos para determinação da atividade enzimática, nas condições pré-estabelecidas. Um controle, amostra incubada nas mesmas condições sem os metais, foi feito simultaneamente.

Quando a enzima foi incubada, na presença dos íons Ca^{+2} e Mn^{+2} nas temperaturas de 60 e 90°C, foi observado que a mesma foi mais estável que quando incubada nas mesmas temperaturas na ausência destes metais (Figura 11).

Na temperatura de 90°C (Figura 11c) a atividade enzimática após 15 minutos de incubação era de 49%. Na presença do Ca^{+2} e do Mn^{+2} , a atividade aumentou para 81% e 107 % respectivamente. Nesta mesma temperatura e na ausência destes metais, a enzima perdeu completamente a atividade após 30 minutos de incubação. Entretanto, na presença dos mesmos, a enzima só foi completamente inibida após 45 e 60 minutos de incubação respectivamente.

Quando incubada a 60°C (Figura 11b), a enzima manteve-se estável após 1 hora de incubação na presença de Mn^{+2} , apresentando ainda 98% de atividade após este período de tempo. Esta atividade foi 9 vezes maior que a atividade encontrada para a amostra controle. Na presença do Ca^{+2} a enzima apresentou uma atividade 5 vezes maior que na sua ausência, mostrando a importância deste íon na estabilização da enzima. O íon Mn^{+2} foi ainda mais eficiente que o íon Ca^{+2} na estabilização da protease. Após 135 minutos do tratamento térmico, a enzima ainda apresentava 46% de atividade em presença de Mn^{+2} , enquanto que nenhuma atividade foi encontrada na amostra controle.

O comportamento da enzima na temperatura de 40°C (Figura 11a) foi diferente do observado para as temperaturas de 60 e 90°C. Para essa temperatura, o efeito do íon Ca^{+2} e Mn^{+2} foi mais significativo ao final do período de incubação. Após 45 minutos de incubação, foi verificado que não houve diferença entre as amostras tratadas com os metais e a amostra controle. Porém após 90 minutos a eficiência destes íons em estabilizar a enzima começa a ser observada, pois as amostras contendo Mn^{+2} e Ca^{+2} , apresentaram uma atividade cerca de três e 2,5 vezes maior que as observadas na ausência destes íons respectivamente. A amostra controle perdeu completamente a atividade após 135 minutos de tratamento térmico, enquanto as amostras contendo Mn^{+2} e Ca^{+2} ainda apresentavam 46% e 15% de atividade respectivamente.

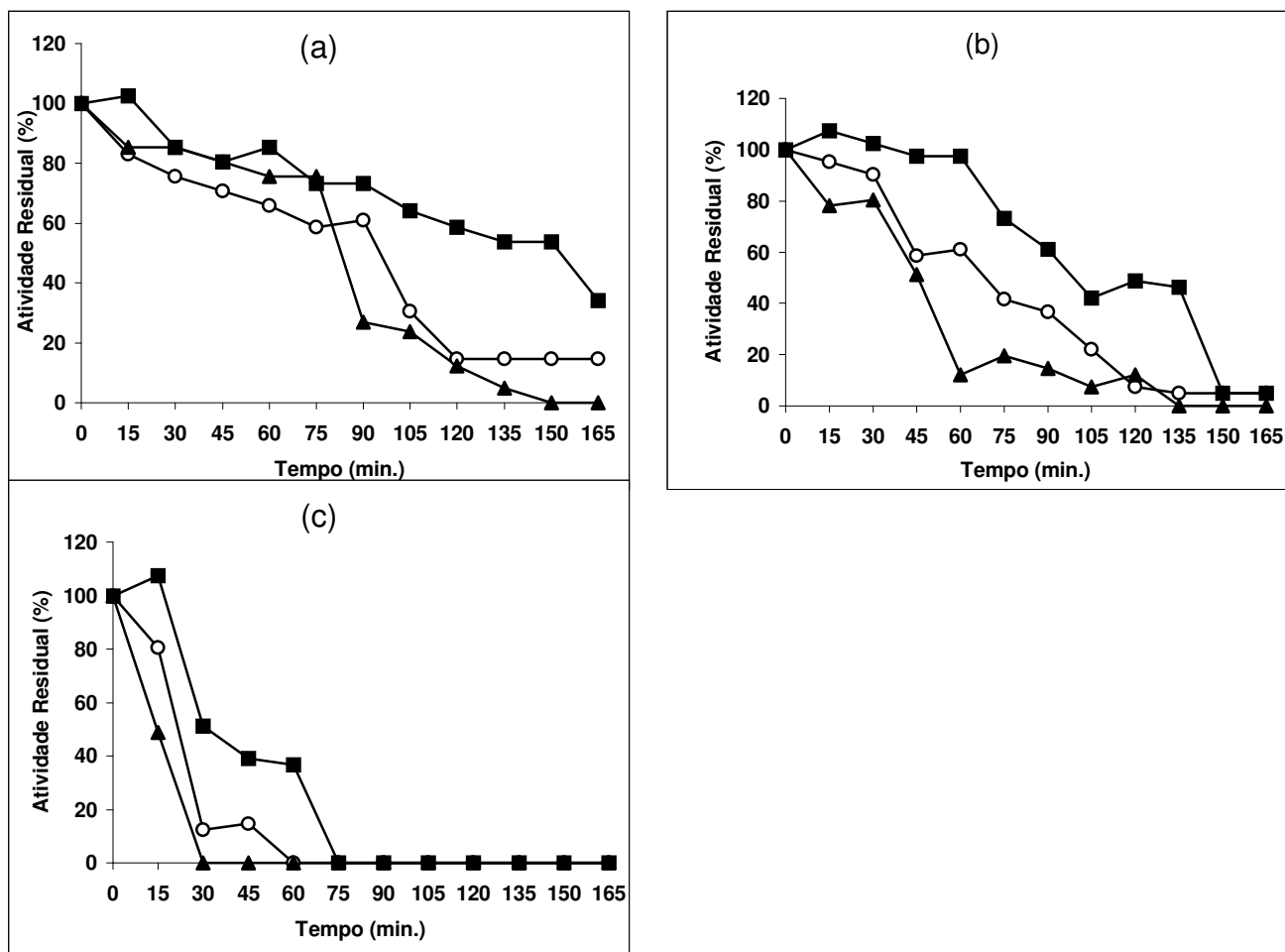


Figura 11 – Estabilidade térmica da protease em ausência (●) e presença de Ca^{+2} (○) e Mn^{+2} (●) nas temperaturas de 40 °C (a); 60°C (b) e 90°C (c). Os resultados são fornecidos em % de atividade residual. 100% de atividade = 1,763U/mg de proteína

De acordo com Beg e Gupta (2003) os íons cálcio têm sido reconhecidos como estabilizadores de enzimas em elevadas temperaturas, além de contribuírem para o aumento da estabilidade térmica de algumas enzimas. Porém, eles verificaram que a presença destes íons afetou a estabilidade térmica de protease produzida por *Bacillus mojavensis* somente nas temperaturas de 60 e 65°C, não sendo encontrado nenhuma interferência ou efeito estabilizador em temperaturas maiores que 70°C. De acordo com o autor, o papel do cálcio na estabilização enzimática está ligado à manutenção da conformação do sítio ativo da enzima em elevadas temperaturas.

Ghorbel et al. (2003) verificaram um aumento na termoestabilidade de uma protease produzida por *Bacillus cereus* BG1 de 450, 285 e 157% em

presença de Ca^{+2} , Mg^{+2} e Mn^{+2} respectivamente, quando incubadas na temperatura de 60°C . De acordo com os autores o papel do Ca^{+2} na estabilização da protease pode ser explicado pela grande força de interação entre as moléculas de proteína, devido à ligação destes íons no sítio ativo da mesma, impedindo sua desnaturação. Os autores também verificaram que o efeito do Ca^{+2} foi mais importante nas temperaturas maiores que 37°C . Em temperatura inferior a 37°C não houve contribuição do Ca^{+2} para a estabilidade da protease.

Em um estudo semelhante realizado por Johnvesly e Naik (2001), também foi verificado um aumento na estabilidade térmica da protease na presença do Ca^{+} . Além deste elemento, o Fe^{+3} e o Mn^{+2} também conferiram um aumento na estabilidade térmica da protease produzida por *B. mojavensis* (Kumar et al., 1999).

Diferentes proteínas são desnaturadas em diferentes temperaturas. O calor fornece energia para romper as interações não-covalentes (pontes de hidrogênio e ligações iônicas), que estabilizam a estrutura nativa da proteína, expondo e permitindo a interação de grupos hidrofóbicos presentes no seu interior (Araújo, 1995). Um aumento da temperatura favorece vibrações no interior da molécula e a energia dessas vibrações pode torna-se grande o suficiente para desfazer a estrutura primária da proteína (Campbell, 2001).

O mecanismo de desnaturação por efeito da temperatura é altamente complexo e envolve primeiramente desestabilização da maioria das interações não-covalentes. As pontes de hidrogênio, interações eletrostáticas e de Van der Waals são interações exotérmicas, sendo desestabilizadas à alta temperatura e estabilizadas à baixa temperatura. Porém, como as pontes de hidrogênio se encontram no interior da cadeia peptídica, elas são mais estáveis em uma faixa mais ampla de temperatura. De outro lado, as interações hidrofóbicas são endotérmicas, sendo estabilizadas em temperaturas elevadas e desestabilizadas em temperatura baixa. Assim, com o aumento da temperatura a estabilidade nestes dois tipos de interações se opõe.

Em um estudo realizado por Declerck et al. (2000) sobre os determinantes estruturais da termoestabilidade de α -amilase de *B. licheniformis* ficou constatado que a presença de 2 íons cálcio próximo ao sítio ativo da enzima, tem grande contribuição para sua termoestabilidade, uma vez que ordenam a estrutura da enzima por meio de ligações com determinados aminoácidos.

Vários pesquisadores (Ghorbel et al., 2003; Beg e Grupta, 2003; Joo et al., 2002; Singh et al., 2001; Banerjee et al., 1999) tem demonstrado que a adição de metais ao extrato bruto de algumas enzimas, promove o aumento da termoestabilidade das mesmas.

Geralmente ligantes de Ca^{+2} são grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e essas ligações aumentam a termoestabilidade das cadeias polipeptídicas por redução de sua flexibilidade (Ward e Young, 1998).

4.2.6. Efeito do Cálcio, Manganês e da Glicina sobre a estabilidade térmica da protease

Um estudo mais detalhado sobre o efeito de cálcio, manganês e glicina na estabilidade térmica da protease, foi realizado incubando-se a enzima à 60°C em presença e ausência de MnSO_4 , CaCl_2 , glicina, uma mistura de glicina + MnSO_4 e uma mistura de glicina + CaCl_2 . As concentrações de MnSO_4 e CaCl_2 foram de 10 mM e a concentração de glicina foi de 1mM. A intervalos de 15 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade enzimática, a qual foi acompanhada por 2 horas e 50 minutos (Figura 12).

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%.

Esse aumento na estabilidade térmica foi verificado em todos os intervalos de tempo analisados e a utilização simultânea de glicina e metais foi ainda mais efetiva. Após 1 hora de incubação, a enzima apresentou uma atividade residual de 76% em presença de glicina, 61,1% em presença de cálcio, 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.

A protease perdeu completamente a atividade após 75 minutos de incubação em ausência dos metais, enquanto que na presença de cálcio + glicina e manganês + glicina, a atividade se estendeu até o período final de análise, onde foi encontrado atividade de 21% e 47% respectivamente.

Abd et al., 1994, encontraram resultados semelhantes para uma protease secretada por *B. stearothermophilus* em que o Ca^{+2} e o Mn^{+2} aumentaram a estabilidade térmica desta enzima. Eles constataram, porém, que o efeito de Ca^{+2} foi mais pronunciado que do Mn^{+2} e que possivelmente, apenas o Ca^{+2} seria suficiente para aumentar a estabilidade térmica da enzima. Além disso, Cowan e Daniel (1982), também encontraram um aumento na estabilidade térmica da protease em presença de cálcio.

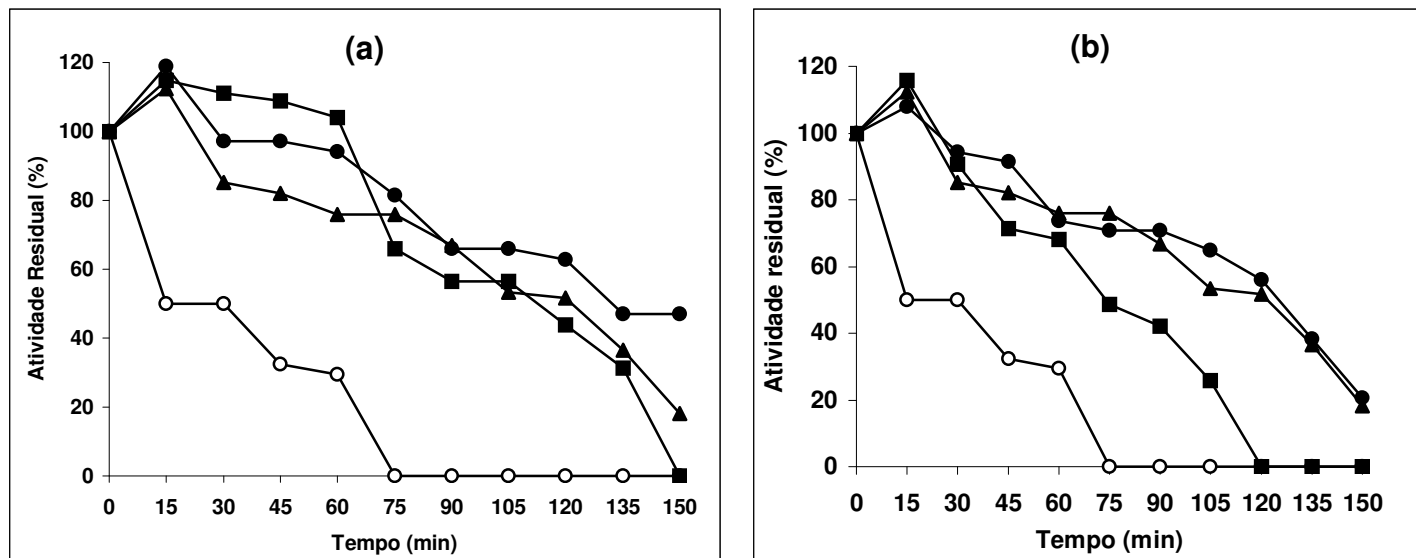


Figura 12 – Termoestabilidade da protease produzida por *Bacillus* sp SMIA-2 a 60 °C , (a) em presença de MnSO_4 (<), glicina (●), glicina + MnSO_4 (◼) e controle (○), (b) em presença de CaCl_2 (<), glicina (●), glicina + CaCl_2 (◼) e controle (○).

Muitas enzimas são mais estáveis em presença de seus substratos, coenzimas ou moduladores. Baixas concentrações de cátions bivalentes como os metais Ca^{+2} , Mg^{+2} e Zn^{+2} , possuem um papel específico no aumento da termoestabilidade de certas enzimas. Açúcares, incluindo glicerol, sorbitol, etileno glicol e polímeros como polietileno glicol, dextranas e proteínas também aumentaram a estabilidade térmica das enzimas. Os metais promovem a manutenção da estrutura terciária de algumas enzimas. Os íons cálcio são ligantes de grupos carboxílicos de asparagina e glutamina e aumentam a estabilidade térmica por redução da flexibilidade das enzimas além de reduzir os efeitos negativos de cargas na molécula de proteína (Wiseman, 1985).

4.2.7. Efeito de alguns inibidores e surfactantes na atividade da protease

O estudo do efeito de alguns inibidores e surfactantes na atividade da protease foi realizado incubando-se a enzima em presença de Triton X-100 (1-5% v/v), SDS (0,1 a 0,5%p/v), peróxido de hidrogênio (2,5 e 5,0 %v/v) e EDTA (1,2,5 e 10mM), por 15 e 30 minutos na temperatura de 60°C, seguida da determinação da atividade enzimática como especificado previamente. A atividade da amostra controle foi determinada pela incubação do substrato na ausência dos inibidores ou sulfactantes e considerada como sendo 100%.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 o EDTA, um metalo-inibidor não afetou a atividade da protease quando utilizado nas concentrações de 1,0 a 5,0mM, o que sugere que esta enzima não é uma metaloprotease. Esses resultados são similares aos encontrados por Tunga et al (2003), que mostraram que uma protease produzida por *Aspergillus parasiticus* também não foi inibida por 5,0mM de EDTA. Entretanto, quando uma concentração de 10mM foi utilizada, a enzima perdeu 16 % de sua atividade quando incubada por 30 minutos na presença deste composto. Uma protease produzida por *Bacillus licheniformis* ATCC 21415, estudada por Mabrouk et al, 1999, foi inibida por 20mM de EDTA, perdendo cerca de 62% de sua atividade inicial. Esses autores atribuem o resultado ao efeito quelante exercido pelo EDTA sobre os íons cálcio, que são necessários para a atividade enzimática.

De acordo com Beg e Gupta (2003) a estabilidade de enzimas em presença de EDTA é uma grande vantagem para sua utilização em detergentes, porque estes compostos possuem uma elevada concentração de agentes quelantes, que auxiliam na redução da tensão superficial da água, além de se ligarem aos íons metálicos tornando-os indisponíveis na solução detergente.

Quando incubada na presença de Triton X-100 (1-2%) por 15 minutos, a enzima teve sua atividade estimulada, porém com o aumento deste tempo para 30 minutos e da concentração do composto para 3,4 ou 5% a atividade da enzima foi inibida. De acordo com Rocha, (S.D.), os tensoativos não iônicos como Triton X-100, na maioria das vezes não induzem alterações conformacionais nas proteínas, que causem perdas de suas atividade biológicas, ao contrário dos tensoativos aniônicos e catiônicos, com características desnaturantes.

O Triton X-100 não é eficiente na quebra das interações proteína-proteína, fazendo com que elas conservem sua estrutura quaternária em sua presença.

Tabela 4 – Efeito de vários inibidores ou surfactantes na atividade da protease

Inibidores/ surfactantes	Atividade Residual (%)	
	Tempo (minutos)	
	15	30
Controle	100	100
EDTA 1mM	107	106
EDTA 2mM	107	106
EDTA 5mM	104	105
EDTA 10mM	94	84
Triton X-100 1%	121	47
Triton X-100 2%	118	84
Triton X-100 3%	93	47
Triton X-100 4%	32	5
Triton X-100 5%	56	3
H ₂ O ₂ 2,5%	95	53
H ₂ O ₂ 5%	10	0
SDS 0,1%	Nd	86
SDS 0,2%	Nd	37
SDS 0,3%	Nd	3
SDS 0,4%	0	0
SDS 0,5%	0	0

A enzima foi pré-incubada a 60°C por 15 e 30 minutos em presença dos inibidores ou surfactantes. A atividade é expressa como percentagem de atividade em ausência de inibidores ou surfactantes. nd = não detectado. 100% de atividade = 4,47U/mg proteína.

A enzima mostrou boa estabilidade na solução de peróxido de hidrogênio (2,5%p/v) quando incubada por 15 minutos a 60°C. Na presença de 0,1% de SDS a enzima manteve 86% de sua atividade inicial após 30 minutos a 60°C, porém em concentrações maiores que 0,3%, a enzima foi completamente inibida.

De acordo com Fennema, 1996, detergentes como dodecil sulfato de sódio (SDS), são potentes agentes desnaturantes de proteínas. Na concentração de 3 - 8 mM, eles são capazes de desnaturar proteínas globulares. O mecanismo envolve uma ligação do detergente a uma molécula desnaturada da proteína. Isso acarreta uma troca no equilíbrio entre seu estado nativo e seu estado desnaturado. Diferente do que ocorre com a uréia, o detergente se liga fortemente à proteína desnaturada, promovendo a completa desnaturação da mesma.

Quando esta ligação é fraca, a desnaturação induzida por detergente pode ser reversível. Quando uma proteína globular é desnaturada por detergente, forma-se uma haste helical na solução do SDS, que é considerada a conformação desnaturada da proteína.

4.3. Compatibilidade da protease com detergentes comerciais

Um dos pré-requisitos para a utilização de uma enzima na formulação de um detergente é sua compatibilidade com este composto. Assim, a compatibilidade da enzima semi-purificada foi testada nos seguintes detergentes comerciais: Ariel[®], Ultra Biz[®], Cheer[®], Tide[®], Campeiro[®] e Omo[®]. Estes foram diluídos em água destilada a uma concentração final de 7mg/mL para simular condições de lavagem e tratados termicamente (100°C/15 minutos) para inativar as enzimas que poderiam fazer parte de sua formulação.

A protease, em uma concentração de 0,55mg/mL, foi adicionada na preparação do detergente e incubada a 60°C/1h nesta solução. A intervalos de 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da atividade residual dos tratamentos e do controle (enzima incubada sem nenhum detergente).

A protease produzida por *Bacillus* sp. SMIA-2, manteve mais de 80% e 65% de atividade após 30 minutos de incubação em presença do detergente Tide e Cheer respectivamente (Figura 13). O detergente que causou maior inibição na atividade da protease foi o detergente Ariel, onde com apenas 10 minutos de incubação a enzima já havia perdido cerca de 66% de atividade.

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. SSR1, apresentou uma atividade residual de 70% na maioria dos detergentes estudados a 40°C (Singh et al., 2001). De acordo com os autores, em temperaturas maiores que 40°C, a enzima requer a adição de agentes estabilizantes como cálcio, para que a enzima se mantenha estável.

O detergente Tide, que possibilitou melhor atividade enzimática, foi adicionado de íons Ca⁺², Mn⁺² e de glicina para avaliar o efeito destes na estabilidade da enzima na solução detergente. Para isto foi adicionado à solução detergente além da enzima, CaCl₂ (10mM), MnSO₄ (10mM), glicina (1mM), uma

mistura de CaCl_2 (10mM) + glicina (1mM), MnSO_4 (10mM) + glicina (1mM). De acordo com os resultados apresentados na Figura 14a após a suplementação da solução detergente com Ca^{+2} e glicina, a enzima manteve-se estável por 30 minutos a 60°C , apresentando uma atividade residual maior que 85% de atividade após 1 hora.

Em presença de MnSO_4 e glicina a enzima manteve mais de 65% de sua atividade após 1 hora na presença do detergente Tide (Figura 14b).

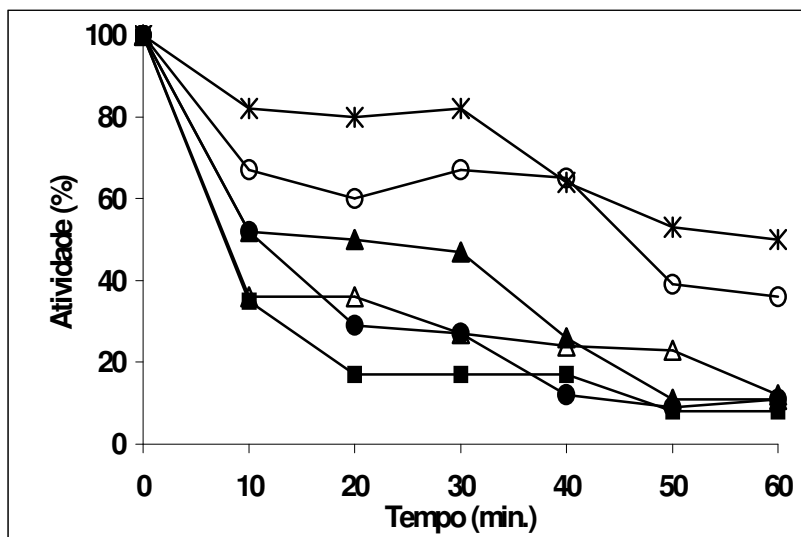


Figura 13 – Compatibilidade da protease de *Bacillus* sp espécie SMIA-2 com detergentes comerciais (v Ariel[®], • Biz[®], O Cheer[®], *Tide[®], λ Campeiro[®], Δ Omo[®]). A atividade é expressa como percentual da atividade enzimática encontrada em ausência de detergentes. A enzima foi incubada na solução detergente a $60^\circ\text{C}/60$ min.

Uma protease produzida por *Bacillus brevis* mostrou compatibilidade com detergentes comerciais como Ariel, Surf excels, Surf Ultra e Rin em presença de cálcio e glicina (Banerjee et al., 1999). Esta enzima manteve mais de 50% de atividade com a maioria dos detergentes testados após 3 horas de incubação a 60°C . Bhosale et al. (1995) mostraram que uma protease produzida por *Conidiobolus coronatus* foi estável a vários detergentes comerciais a 50°C , em presença de 25mM CaCl_2 .

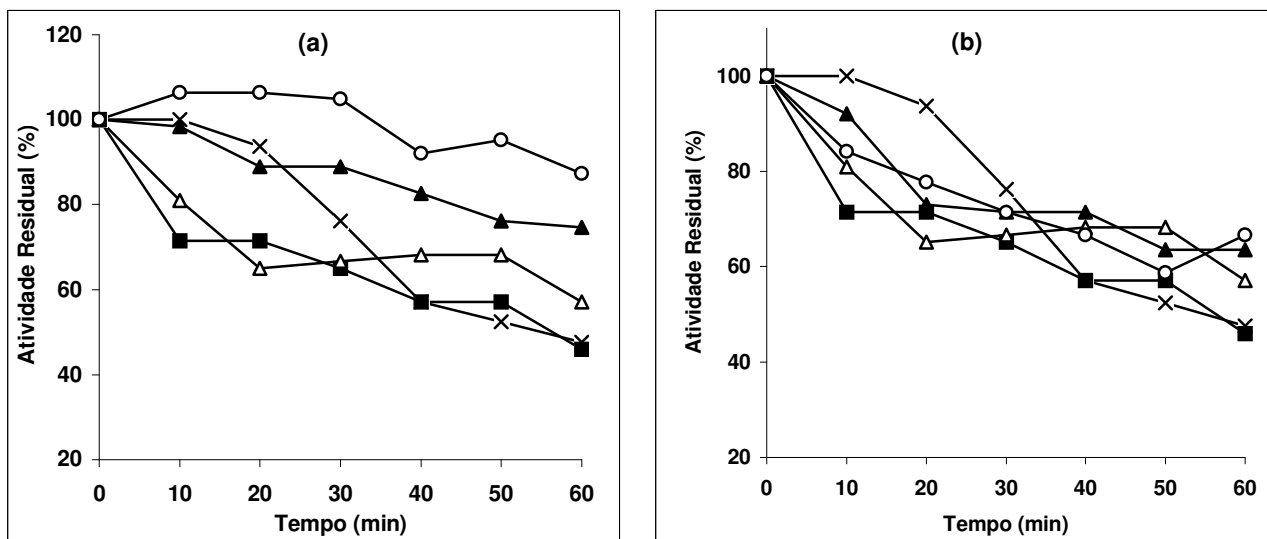


Figura 14 – Compatibilidade da protease produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 com detergente Tide[®]. **(a)** (x controle, ● enzima + detergente, Δ enzima + glicina + detergente, ● enzima + CaCl₂ + detergente, O enzima + glicina + CaCl₂ + detergente) e **(b)** (x controle, ● enzima + detergente, Δ enzima + glicina + detergente, ● enzima + MnSO₄ + detergente, O enzima + glicina + MnSO₄ + detergente)

4.4. Utilização de soro de leite e água de maceração de milho para a produção da protease

Recentemente vários resíduos agroindustriais são usados como substratos para a produção de enzimas devido a disponibilidade local e por representarem uma fonte alternativa de baixo valor comercial, principalmente quando se visa a produção desta enzima em larga escala. Neste sentido, foi avaliada a atividade da protease pelo microrganismo em estudo, quando foi cultivado em um meio contendo soro de leite e água de maceração de milho, que além de constituírem fontes baratas de nutrientes, são substratos amplamente disponíveis.

Para este estudo, o nitrato de amônio presente no meio de cultura foi substituído por 0,1% de soro de leite. Os resultados desta alteração do meio estão mostrados na Figura 15a, onde pode se observar que a enzima apresentou uma atividade máxima de 25U/mgPtn. Este valor corresponde a um aumento de cerca de 3 vezes na atividade proteásica encontrada no meio de crescimento contendo nitrato de amônio. O tempo requerido para que a enzima atingisse seu pico de atividade máxima que antes era de 9 horas, passou para 16 horas de

crescimento, o que poderia ser compensado pela redução no custo do meio de cultura.

Posteriormente, o meio foi novamente alterado substituindo o citrato trissódico (1%) do meio de cultura pela água de maceração de milho (0,5%). A combinação destes dois resíduos não só aumentou surpreendentemente a atividade da enzima, como também retardou o processo de desativação que é típico da produção de proteases (Figura 15b). A atividade máxima da enzima foi de 59,47 U/mgPtn, sendo que após 18 horas de crescimento do microrganismo, a enzima se manteve estável por mais de 20 horas o que favorece a produção desta enzima em larga escala.

A água de maceração de milho tem sido considerado em alguns trabalhos como sendo uma fonte de nitrogênio relativamente barata e satisfatória para a produção de proteases. Além de beneficiar o meio de crescimento pelo fornecimento de fonte de nitrogênio, este resíduo fornece vários micro-nutrientes, vitaminas e fatores estimulantes do crescimento microbiano (Kumar e Takagi, 1999).

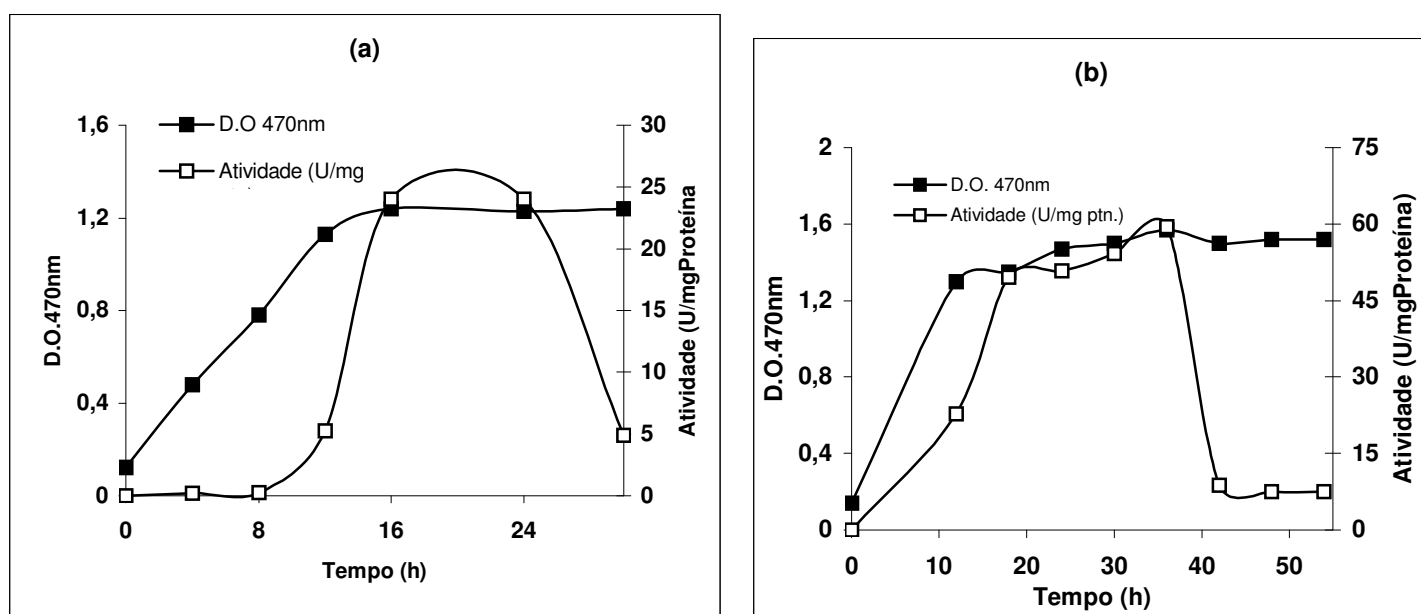


Figura 15 - Curva de crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2 crescendo a 50 °C no meio basal contendo (a) 1% citrato trissódico e 0,1% de soro de leite e (b) 0,5% água de maceração de milho e 0,1% soro de leite.

4.4.1. Perfil do crescimento e atividade proteásica do *Bacillus* sp. SMIA-2

O crescimento do microrganismo e a atividade da protease em função do tempo de fermentação foram observados por 60 horas no meio de cultura contendo a água de maceração de milho (0,5%) e o soro de leite (0,1%) (Figura 16).

A atividade máxima da enzima (70,0U/mgPtn) foi observada na fase estacionária de crescimento, com 28 horas de incubação. A enzima foi estável por 20 horas e após 40 horas de crescimento a sua atividade decresceu rapidamente atingindo níveis de 8,1U/mgPtn, após 60 horas de incubação.

Meios de cultura ricos em proteínas, como aqueles contendo o soro de leite, possuem indutores que levam a produção de proteases. Por isso, grandes quantidades desta enzima tem sido produzida utilizando o soro de leite, um resíduo das indústrias de laticínios (Romero et al., 2001). Portanto, a utilização do soro de leite, além de contribuir para a redução de poluentes ambientais, favorece também a redução dos custos do meio de cultura utilizados para a produção das proteases.

De acordo com Maurer, 2004, o meio de cultura utilizado para a fermentação industrial contribui muito no custo de produção de enzimas em larga escala, devido à utilização de grandes volumes de meio. Portanto, é necessário aliar elevada produtividade com fontes de carbono e de nitrogênio, para que a produção seja mais viável.

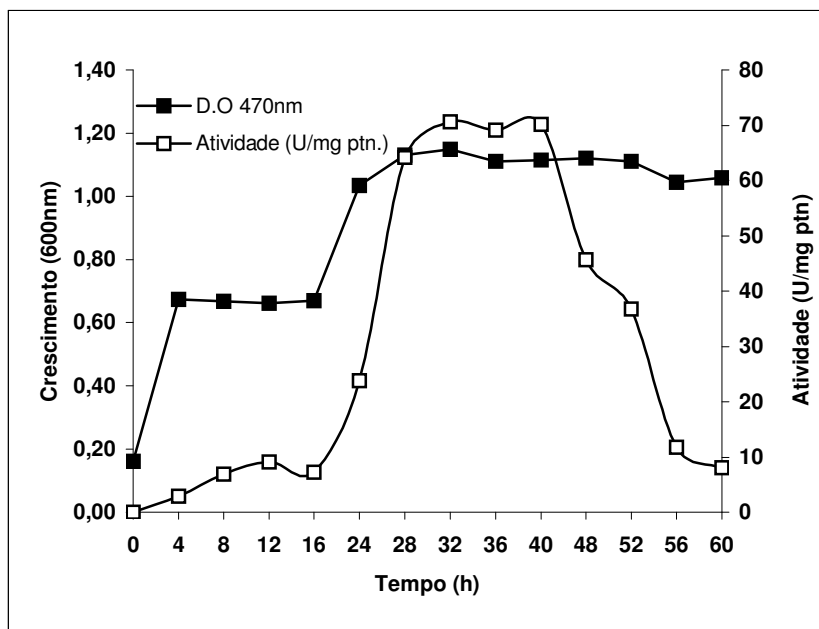


Figura 16 – Curva de crescimento e produção de protease por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, crescendo em soro de leite (0,1%) e água de maceração de milho (0,5%), a 50° C por 60 horas.

4.4.2. Caracterização parcial da protease secretada pelo microrganismo quando cultivado no soro de leite e na água de maceração de milho

4.4.2.1. Temperatura ótima e estabilidade térmica

Para a determinação da temperatura ótima da protease o microrganismo foi crescido no meio contendo os resíduos por 36 horas a 50°C e atividade da enzima determinada como descrito anteriormente nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C.

A atividade da enzima aumentou com o acréscimo da temperatura, atingindo seu valor máximo à 70°C, com níveis de 71,56U/mgPtn, conforme mostrado na Figura 17. Nas temperaturas de 60°C e 80°C a enzima apresentou 72,16% e 67,08% de sua atividade, máxima, respectivamente.

Kim et al (2002), encontraram resultados semelhantes para *B. stearothermophilus* em que a temperatura ótima da enzima foi de 75°C com a azocaseína como substrato. Este valor foi similar aos encontrados para outras proteases termoestáveis produzidas por *Bacillus* sp. (Hamer e Manson, 1987).

Joo et al., 2005, encontraram temperatura ótima de 60 a 65°C para uma protease produzida por *Bacillus* sp. I-312. De acordo com estes autores, a

protease perdeu rapidamente a atividade quando incubada a 70°C. Duas proteases produzidas para a utilização na indústria de detergentes, a Alcalase® e a Esperase®, possuem temperaturas ótimas de atividade por volta de 60°C, com rápida perda de atividade em temperaturas maiores que 70°C (Godfrey e West, 1996).

A estabilidade térmica da protease determinada após a incubação da enzima por 1 hora nas temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 e 90°C em presença e ausência de 10mM de CaCl₂ é mostrado na Figura 18.

Na presença do cálcio, a enzima foi mais estável, sendo que a contribuição deste íon para a estabilidade da protease, foi mais efetivo em temperaturas mais elevadas, ou seja, na faixa de 60 a 90°C.

Nas temperaturas de 40 e 50°C, a contribuição do cálcio na estabilidade térmica da enzima foi menos pronunciada. Quando incubada por 1 hora a 40°C na presença e ausência do cálcio, a enzima manteve 91,75% e 90,4% de sua atividade respectivamente.

A 70°C, a enzima manteve 91,11% de atividade em presença de cálcio e 76,7% de atividade na sua ausência. Na temperatura de 80°C, a contribuição do cálcio foi ainda mais pronunciada e a enzima manteve 66,7% e 37,98% de sua atividade em presença e ausência deste elemento respectivamente, o que demonstra que quanto mais elevada a temperatura, maior o efeito do cálcio na estabilidade da enzima.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Gessesse et al. (2003), onde a dependência do cálcio para a estabilidade térmica de uma protease produzida por *Bacillus pseudofirmis*, ocorreu apenas em temperaturas maiores que 50°C. De acordo com estes autores a dependência do cálcio pelas enzimas está relacionada à presença deste metal como ligante do seu sítio ativo, levando a um maior estabilização da enzima. No estudo realizado por eles, a enzima perdeu cerca de 80% de sua atividade inicial em ausência de cálcio, na temperatura de 70°C. Vários outros autores têm demonstrado o efeito do cálcio na estabilidade térmica de proteases a elevada temperatura. Eles atribuem este fato ao efeito protetor exercido pelo cálcio na manutenção da conformação ativa da enzima em elevadas temperaturas (Beg e Gupta, 2003).

Segundo Godfrey e West (1996), mais de 75% de todas as enzimas conhecidas requerem a presença de íons metálicos para ativar sua atividade

catalítica, sendo que concentrações extremamente baixas destes compostos podem ser suficientes para aumentar sua estabilidade térmica.

A atividade enzimática em temperaturas elevadas favorece a utilização das enzimas em soluções detergentes, devido à utilização de temperaturas elevadas nos processos de limpeza. Entretanto, a elevada dependência do cálcio para a estabilidade térmica da protease não é desejável quando o objetivo é sua utilização em soluções de detergentes, uma vez que estes compostos possuem elevada concentração de agentes quelantes como EDTA, que poderá seqüestrar o cálcio e reduzir drasticamente a atividade da enzima (Gessesse et al., 2003).

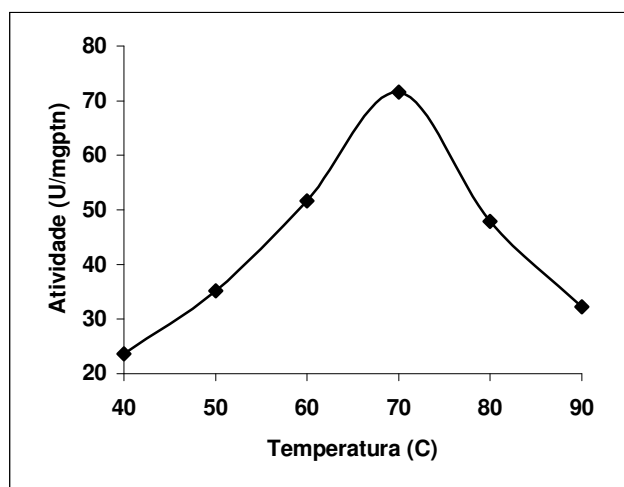


Figura 17 – Temperatura ótima da protease produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho.

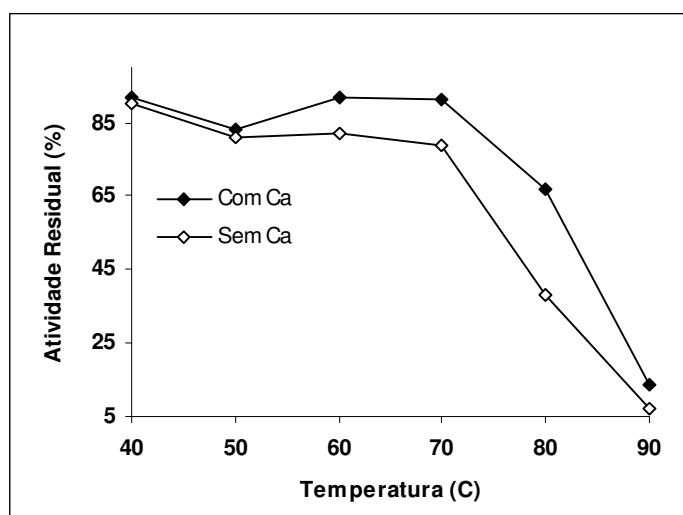


Figura 18 - Estabilidade térmica da protease produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho, em presença e ausência de cálcio. (71,56U/mg de proteína = 100% de atividade).

4.4.2.2. Determinação do pH ótimo e estabilidade da enzima ao pH

Para determinação do pH ótimo da enzima, a solução de azocaseína (substrato) foi preparada em solução tampão a diferentes valores de pH, variando de 5,5 a 10,0.

A enzima foi ativa em uma ampla faixa de pH variando de 7 a 9, apresentando máxima atividade (69,97U/mgPtn) em pH 8,0 como mostra a Figura 19. A atividade mais baixa da protease foi encontrada em pH 5,5 e 10, que foram os valores mais extremos estudados.

De acordo com Wiseman (1985), a alteração na atividade enzimática em função do pH, deve-se à presença de grupos ionizáveis em sua estrutura. Uma vez que são proteínas, as enzimas sofrem alterações em sua conformação dependendo do pH, o que também altera a capacidade de sua união ao substrato, afetando assim, a sua atividade catalítica.

A Alcalase[®], enzima muito utilizada na indústria de detergentes, possui pH ótimo de atuação na faixa de 8-9. O valor de pH da solução detergente é um importante parâmetro para determinar a viabilidade da aplicação de determinado tipo de enzima e a atividade catalítica em valores elevados de pH (10-11) ou mesmo moderadamente elevados (8-9), indica que a enzima é bastante viável para ser utilizada em detergentes (Godfrey e West, 1996).

Em relação à estabilidade ao pH, a enzima foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente, em solução tampão preparada com diferentes valores de pH (de 5,5 a 10,0) A enzima manteve 83,91% e 77,03% de sua atividade quando incubada por 1 hora em pH 8 e pH 8,5 respectivamente (Figura 20). Em pH 9,0, a atividade residual foi de 77,85%, enquanto que em pH 5,5 e 10,0, a enzima manteve apenas 33,68% e 39,74% de atividade residual, respectivamente.

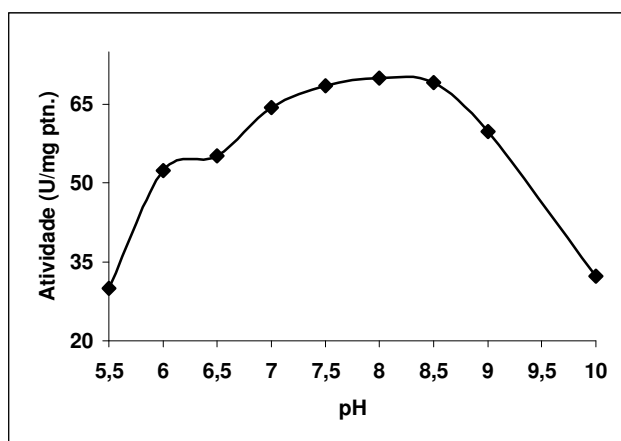


Figura 19- Determinação do pH ótimo da protease produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, crescido à 50°C/36h em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho.

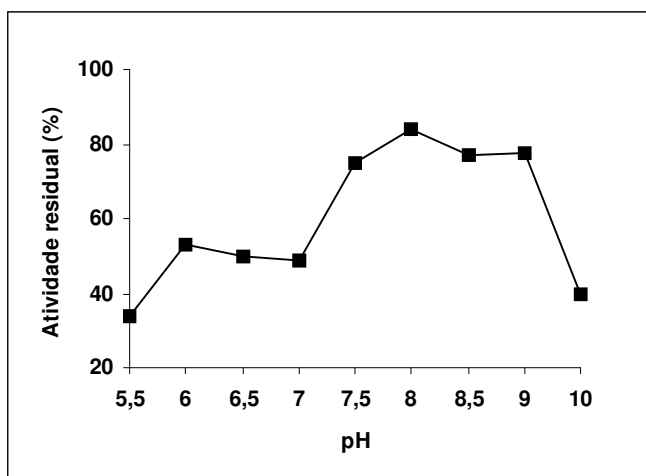


Figura 20 - Estabilidade ao pH da protease secretada por *Bacillus* sp. SMIA-2, crescido em meio líquido contendo soro de leite e água de maceração de milho à 50°C/36h. (100% de atividade = 69,97 U/mgPtn).

4.2.3. Atividade enzimática em detergentes comerciais da protease produzida em resíduos agroindustriais

Uma das formas de se avaliar a viabilidade da utilização de enzimas em detergentes é a verificação da compatibilidade da mesma com os componentes do detergente. Assim, a enzima foi incubada na temperatura de 70°C na presença de uma solução detergente e a intervalos de 10 minutos foram retiradas amostras para determinação da sua atividade residual. De acordo com os resultados encontrados, a enzima foi altamente estável nas soluções de detergentes estudadas, mantendo uma elevada atividade residual (Fig. 21).

A utilização da glicina juntamente com íons cálcio resultou em um aumento da estabilidade enzimática em todos os detergentes testados. Em presença do detergente Ultra bizz[®], Cheer[®] e Tide[®], a enzima manteve aproximadamente 100% de atividade após 30 minutos de incubação a 70° C.

De acordo com Godfrey e West (1996) todas as proteases adicionadas em detergentes podem ser estabilizadas pela adição de certo nível de cálcio livre. Na maioria das vezes cerca de 100 a 1000 ppm de cálcio são adicionadas em detergentes líquidos que contém proteases, para aumentar sua estabilidade. Ainda segundo estes autores, uma das formas de aumentar a estabilidade da enzima na presença de detergentes é evitar sua autólise, o que pode ser conseguido pela adição de inibidores reversíveis de proteases. Esses agentes podem inibir parcialmente a atividade das proteases por ligarem ao seu sítio ativo. Porém, elas podem recuperar novamente sua atividade durante o processo de lavagem no qual serão utilizadas. A glicina é um dos inibidores reversíveis de proteases utilizadas nos detergentes para esta finalidade.

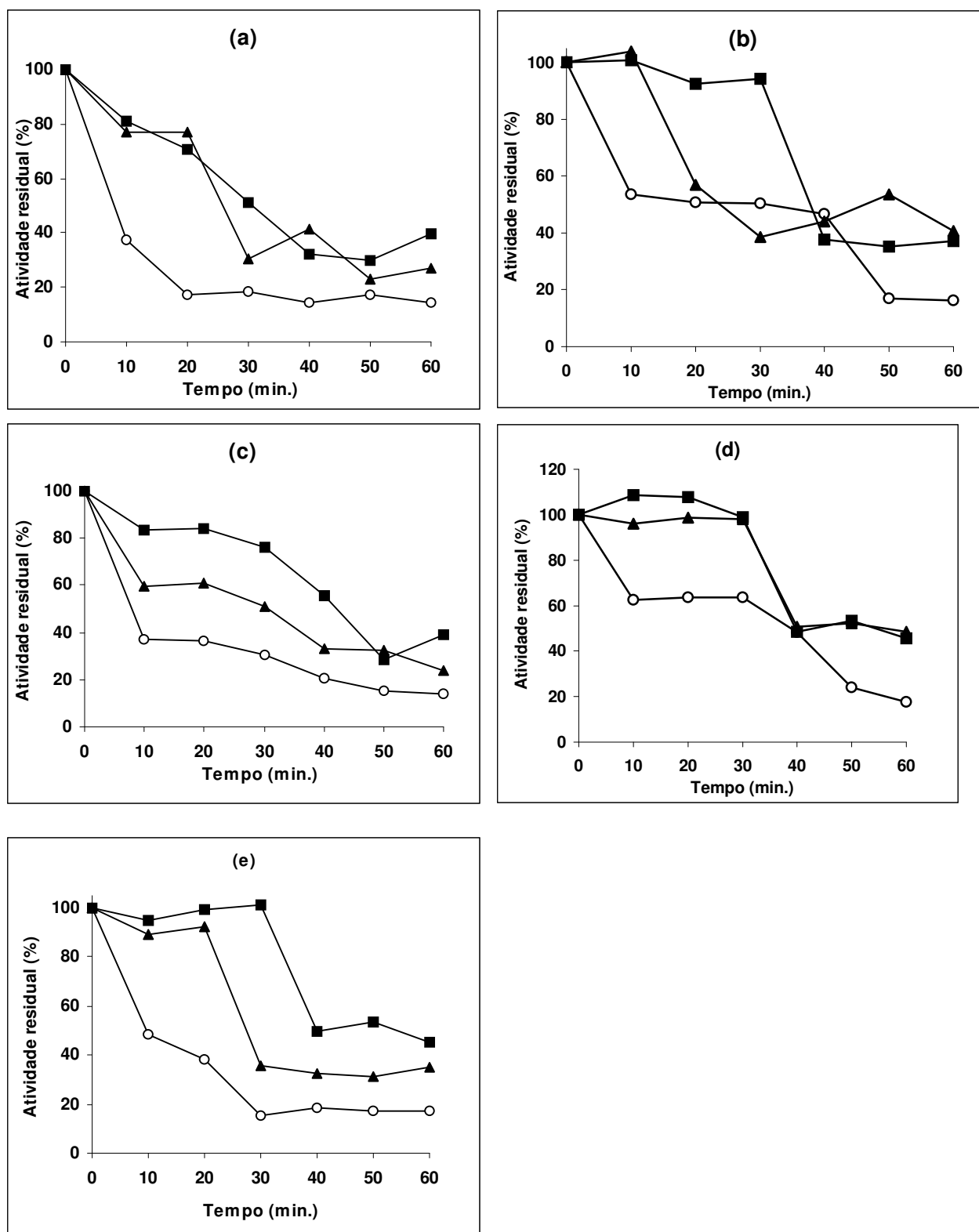


Figura 21 – Estabilidade da protease produzida por *Bacillus* sp. espécie SMIA-2, em detergentes comerciais. (O) detergente e enzima, (●) detergente, enzima e cálcio, (▲) detergente, enzima, cálcio e glicina. Os detergentes estudados foram (a) Ariel, (b) Cheer, (c) Omo, (d) Tide® e (e) Ultra bizz. (100% de atividade = 63,83U/mg de proteína)

5.RESUMO E CONCLUSÕES

Proteases constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais. São utilizadas em várias indústrias tais como a de alimentos, detergentes, farmacêutica e etc. Considerando a grande potencialidade do emprego industrial das proteases, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a produção desta enzima por um microrganismo termofílico, *Bacillus* sp SMIA-2, visando a sua utilização em formulações de detergentes. Além de estudar a influência das condições de cultivo sobre a atividade da protease, foi também investigado algumas propriedades bioquímicas da enzima e sua compatibilidade com alguns detergentes comerciais.

O microrganismo foi capaz de utilizar uma grande variedade de fontes de carbono para a síntese da protease. Entretanto, os compostos que possibilitaram maior atividade enzimática foram o amido e o citrato trissódico com níveis de atividade de 1,14U/mgPtn e 1,11 U/mgPtn respectivamente. Dentre as várias fontes de nitrogênio estudadas, a máxima atividade da protease (1,1U/mg Ptn), foi alcançada quando o nitrato de amônio (NH_4NO_3) foi utilizado no meio de cultura.

A suplementação do meio de cultura com uma solução de traços de metais, promoveu um aumento no crescimento do microrganismo e na secreção da protease, demonstrando a importância destes compostos para a produção da enzima. Além disso, a redução da concentração de fosfato de potássio e o aumento na concentração de CaCl_2 promoveu um acréscimo na atividade da protease, além de aumentar a sua estabilidade.

A protease secretada pelo microrganismo em estudo, apresentou atividade máxima em pH 8,0, o que favorece sua utilização em produtos que possuem pH mais elevado, como os detergentes. Em relação a estabilidade ao pH, a protease manteve 81% de atividade em pH 8,0 e 67% de atividade em pH 9,0 por duas horas de incubação.

A temperatura ótima para atividade da protease foi de 60°C. Quando mantida por 2 horas a 50 e 60°C a enzima perdeu 46 e 77% de sua atividade respectivamente. A incubação da enzima a 90 e 100°C por 2 horas resultou em sua completa inibição.

Íons metálicos como CaCl_2 , BaCl_2 , AgNO_3 , ZnSO_4 , NaSO_4 , FeSO_4 , acetato de cálcio, MnSO_4 e MgSO_4 estimularam a atividade da protease. Por outro lado, íons como KCl , HgCl_2 , CuSO_4 , CsCl e CoSO_4 inibiram a atividade desta enzima. Em presença de 10mM de HgCl_2 a enzima foi completamente inibida.

Na presença do CaCl_2 e do MnSO_4 , a enzima foi mais estável em todas as temperaturas estudadas, sendo o efeito destes compostos mais pronunciado, em temperaturas acima de 40°C. Na presença da glicina em combinação com o CaCl_2 ou MnSO_4 , a protease foi ainda mais estável.

O EDTA, um metalo-inibidor, não afetou a atividade da protease quando utilizado nas concentrações de 1,0 a 5,0mM, o que sugere que esta enzima não é uma metaloprotease.

A enzima apresentou uma boa estabilidade nas soluções detergente estudadas. A melhor atividade enzimática foi encontrada no detergente Tide, onde manteve 80% de atividade após 30 minutos de incubação na temperatura de 60°C. O detergente que causou maior inibição na atividade da protease foi o Ariel, onde com apenas 10 minutos de incubação, a enzima já havia perdido cerca de 66% de atividade.

A adição de Ca^{+2} e glicina na solução detergente aumentou a estabilidade da protease, fazendo com que a mesma se mantivesse estável por 30 minutos a 60°C. Estes resultados foram altamente favoráveis para a utilização desta enzima em soluções detergentes.

Um aumento significativo da atividade da protease foi encontrado quando o microrganismo foi cultivado no meio de cultura contendo soro de leite (0,1%) e água de maceração de milho (0,5%). Além disso, o processo de desativação

desta enzima foi amenizado, uma vez que a mesma permaneceu estável por mais de 20 horas, favorecendo a sua produção em larga escala.

No meio contendo o soro de leite e a água de maceração de milho, a protease secretada pelo microrganismo também aumentou sua temperatura ótima de 60° C para 70° C. A enzima apresentou excelente atividade em presença de alguns detergentes como Ultra bizz, Cheer e Tide, nos quais a enzima manteve aproximadamente 100% de atividade após 30 minutos de incubação a 70°C.

Diante do exposto, pode se concluir que os resíduos, soro de leite e a água de maceração de milho podem ser utilizados como uma fonte alternativa de baixo valor comercial para a produção de proteases extracelulares por *Bacillus* sp SMIA-2. As características desta enzima como pH ótimo, temperatura ótima, estabilidade em soluções detergentes, permitem sua utilização em formulações de detergentes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguiar, C.L., Menezes, T. J. B. (2002) Conversão Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar; *Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento*; 26:52-55.
- Aleksieva, P.; Djerova, A.; Tchorbanov, B.; Girarov, J. (1981). Submerged cultivation of a strain of *Humicola lutea* 72 producing acid protease. *Eur. J. App. Microbiol. Biotech.*, 13:165-169.
- Agência Nacional de Águas (2002). Disponível em: < <http://www.ana.gov.br>>. Acesso em 24 de setembro de 2002.
- Andrade, C.M.M.C.; Pereira JR., N.; Antanikian, G. (1999) Extremely Thermophilic Microorganisms and their polymer-hidrolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, 30:287-298.
- Anwar, A.; Saleemunddin, M. (1998). Alkaline Protease: A Review. *Bioresource Technology*. 64:175-183.
- Araújo, J.M.A. (1995). Química de Alimentos: Teoria e Prática. Viçosa-UFV, Imprensa Universitária, 335p.
- Azeredo, L.A.I.; Freire, D.M.G.; Soares, R.M.A.; Leite, S.G.F.; Coelho, R.R.R. (2004) Production and partial characterization of Thermophilic proteases from *Streptomyces* sp. isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microb Technol* .34: 354–358.
- Bakhtiar, S.; Andersson, M.M.; Gessesse, A.; Mattiasson, B.; Kaul, R.H. (2002). Stability Characteristics of a Calcium-Independent Alkaline Protease from *Nesterenkonia* sp. *Enzyme and Microb Technol*, 32:525-531.

- 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.
- Banik, R. M.; Prakash, M. (2004). Laundry detergent compatibility of the alkaline protease from *Bacillus cereus*. *Microbiological Research*. 159:135-140.
- Barrett, A.J. (1994) Proteolytic Enzyme: aspartic and metallopeptidases. *Methods Enzymol.* 244:1-15.
- Beg, Q. K.; Gupta, R. (2003). Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* 32:294-304.
- Beg, Q.K.; Saxena, R. K.; Gupta, R. (2002). De-repression and Subsequent induction of protease synthesis by *Bacillus mojavensis* under fed batch operations. *Process Biochem.* 78:289-295.
- Bhosale, S.H., Rao, M.B., Deshpande, V.V.; Srinivasan, M.C. (1995). Thermostability of high activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20). *Enzyme Microbiol. Technol.* 17:136-139.
- Brock, T.D. (1985). Life at high temperatures. *Science*. 230:132-138.
- Burkert, J. F. M., Maugeri, F., Rodrigues, M. I. (2004). Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. using factorial design. *Bioresource Technology* . 91: 77-84.
- Campbell, M.K. (2001). *Bioquímica*. 3 Ed. Editora Artmed. Porto Alegre. 752p.
- CETEC-MG (1999) Ensino e Desenvolvimento Tecnológico para Controle Ambiental na Indústria, 195p.
- Cowan, D.A.; Daniel, R.M. (1982). Purification and some properties of an extracellular protease (Caldolysin) from an extreme thermophile. *Biochimica et Biophysica Acta*, 705:293-305
- Chu, I-M; Lee, C.; Li, T-S.(1992). Production and Degradation of Alkaline Protease in Batch Cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb Technol*, 14:755-761.
- Ellouz, Y., Bayoudh, A., Kammoun, S., Gharsallah, N., Nasri, M. (2001) Production of protease by *Bacillus subtilis* grow on sardinelle heads and viscera flour. *Bioresource Technology*, 80:49-51.
- Evangelista, José (2001). *Tecnologia de Alimentos*. 2ª Ed. Editora Atheneu, São Paulo - S.P.,652p.

- Fahmy, A.; Ali, A. A.; Mohamed, S. A. (2004). Characterization of cysteine protease from wheat *Triticum aestivum* (cv. Giza 164). *Bioresource Technology*. 91:297-304
- Feijoo, G.; Moreira, M. T.; Roca, E.; Lema, J.M. (1999). Use of cheese whey as a substrate to produce manganese peroxidase by *Bjerkandera* sp. BOS55. *Journal of Industrial Microbiology e Biotechnology*. 23:86-90.
- Feng, Y.Y.; Yang, W.B.; Ong, S.L.; Hu, J. Y.; Ng, W.J. (2001). Fermentation of starch for enhanced alkaline protease production by constructing an alkalophilic *Bacillus pumilus* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Fennema, O.R. (1996). Food Chemistry. 3 Ed. New York. V.76.
- Ferrero, MA; Castro, G.R.; Abate, C.M.; Baigori, M.D.; Singeriz, F. (1996) Thermostable alkaline proteases of *Bacillus licheniformis* MIR 29: isolation, production and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45:327-332.
- Ferreira, C.L.L.F., Mosquim, M.C.A.V. (1996) Aproveitamento Tecnológico/Racional de Efluentes de Laticínios. IN: *III Encontro Divital de Tecnologia de Laticínios*, UFV, Viçosa-MG.
- Furtado, M.M. A arte e a ciência do queijo. 2. ed., São Paulo: Editora Globo, 1991. 297p.
- Gacesa, P. ; Huble, J. (1990). Tecnologia de las enzimas. Ed. Acribia, S. A. Zaragoza – Espanha.
- García-Gil, J.C., Plaza, C., Soler-Rovira, P., Polo, A., (2000) Long-Term Effects of Municipal Solid Waste Compost Application on Soil Enzyme Activities and Microbial Biomass. *Soil Biochemistry*, 32:1907-1913.
- Gessesse, A. ; Kaul, R.H. ; Gashe, B. A. ; Mattiasson, B. (2003). Novel alkaline protease from alkaliphilic bacteria grow on chicken feather. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:519-524.
- Germano, S.; Pandey, A.; Osaku, C.A.; Rocha, S. N.; Soccol, C.R. (2003). Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. Produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 32:246-251.
- Ghorbel, B., Kamoun, A.S.; Nasri, M. (2003). Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:513-518.
- Gibb, G.D.; Ordaz, D.E.; Strohl, W.R. (1989). Overproduction of extracellular protease activity by *Straptomyces* C5-A13 in fed-batch fermentation. *Applied Microbiol Biotechnol*. 31:119-124
- Godfrey, T.; West, S. (1996). Industrial Enzimology. 2d. Ed. Stockton Press Ed. US e Canadá, 609p.

- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Khan, S.; Chauhan, B. (2002a). An overview on fermentation, downstream processing and properties of alkaline protease. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 60:381-395.
- Gupta, R.; Beg, Q.K.; Lorenz, P. (2002b). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 59:15-32
- Haki, G.D.; Rakshit, S.K. (2003). Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology.* 89:17-34.
- Hamer, G. ; Manson, C. A. (1987). Fundamental aspects of waste sludge treatment: microbial solids biodegradation in an aerobic thermophilic semi-continuous system. *Bioprocess Eng.* 2:69-77.
- Hodgson, J. (1994) the Changing bulk catalysis market: recombinant DNA techniques have changed bulk enzyme production dramatically. *Bio/Technology*, 12: 789-790.
- Hough, D. W.; Danson, M.J. (1999) Extremozymes. *Current opinion in chemical Biology*, 3: 39-46.
- Horikoshi, K. (1999) Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 735-750.
- International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992) *Enzyme Nomenclature*, Academic Press, Orlando
- Jaenicke, R. (2000). Stability and Stabilization of Globular Proteins in Solution. *Journal of Biotechnology.* 79: 193-203.
- Jaenicke, R.; Böhm, G.; (1998). The stability of Proteins in Extreme Environments. *Currents Opinion in Structural Biology.* 8:738-748.
- Janssen, P.H.; Peek, K; Morgan, H.W. (1994). Effect of culture conditions on the production of an extracellular proteinase by *Thermus* sp. Rt41A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41:400-406.
- João, J. J., Zanella, C.R. (2002) Utilização de Enzimas em Meio Orgânico. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Disponível em: www.biotecnologia.com.br; acessado em 28/09/2002.
- Johnvesly, B.; Manjunath, B. R., Naik, G.R. (2002). Pigeon pea waste as a novel, inexpensive, substrate for production of a thermostable alkaline protease from thermoalkalophilic *Bacillus* sp. JB-99. *Bioresource Technology.* 82:61-64.
- 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. *Proc. Biochem.*, 37: 139-144.

- Joo, H.S. ; Chang, C.S. (2005).Production of protease from a new alkalophilic *Bacillus* sp. I-312 grow on soybean meal: optimization and some properties. *Process Biochemistry*. 40:1263-1270.
- Joo, H., Kumar, C.G., Park, G., Kim, K. T., Paik, S. R., Chang, C. (2002) Otimization of the production of na extracellular alkaline protease from *Bacillus horikoshii*. *Process Biochemistry*, 38:155-159.
- Kanekar, P.P., Nilegoankar, S.S., Sarnaik, S.S., Kelkar, A.S. (2002) Optimization of Protease Activity of Alkaliphilic Bacteria Isolated From na Alkaline Lake in India. *Bioresource Technology*, 85: 87-93.
- Kashyap, D.R., Vohra, P. K., Chopra, S. And Tewari, R. (2001). Applications of pectinases in the commercial setor : a review. *Bioresource Technology*, 77(3): 215-227.
- Kim, Y. K.; Bae, J.H.; Oh, B. K.; Lee, W. H.; Choi, J. W. (2002) Enchancemente of protealytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearthermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process. *Biores. Technol.* 82:157-164.
- Kona, R. P.; Qureshi, N., Pai, J. S. (2001). Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor. *Bioresource Technology*. 78:123-126.
- Kosikowski, F.V. (1979). Our Industry Today. *J. Dairy Sci.* 62:1149-1160
- Kristinsson, H. G.; Rasco, B.A. (2000) Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 40 (1),43-81.
- Kumar, S.; Nussinov, R. (2001). How do Thermophilic Deal With Heat. *CMLS Celular and Molecular Life Science*. 58: 1216-1233.
- Kumar, C.G.; Takagi, H. (1999).Research review paper Microbial Alkaline proteases: from a bioindustrial viewpoint. *Biotechnology Advances*. 17:561-594.
- Kumar, C.G.; Tiwari, M.P; Jany, K.D.(1999). Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: Purification and some properties. *Process Biochemistry*, 34:441-449.
- Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. (2001). *Biotechnologia Industrial*. V3: Processos Fermentativos e Enzimáticos. 1ªEd. Editora Edgard Blucher LTDA.
- Madigan, M.T.; Martinko, J. M.; Parker, J. (1996). *Brock Biology of Microorganism*, 8 Edição, Ed. Pretince Hall, New Jersey, 986p.
- Maurer, K. H. (2004). Detergents proteases. *Current opinion in Biotechnology*. 15:330-334.
- Melo, C.H. (2001). Isolamento e Caracterização Parcial de uma Proteinase Secretada por *Bacillus* sp. Termofílico.Tese (Mestrado em Produção Vegetal)-

Campos dos Goytacazes – R.J., Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 65p.

- Ming Chu, I, Lee, C., Li, T.S. (1992). Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416. *Enzyme Microb. Technol.* 14:755-761.
- Mitidieri, S., Martinelli, A. H.S., Camassola, S., Menguer, P. K., Scharank, A., Vainstein, M.H. (2002) Detergentes Biológicos Biodegradáveis – Avaliação das Formulações do Mercado, *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*;26:56-60.
- Moon, S.H.; Parulekar, S. J. (1992). Some Observations on Protease Production in Continuous Suspension Cultures of *Bacillus firmus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 41:43-54.
- Nunes, A. S.; Martins, M.L.L. (2001). Isolation, properties and kinetics of growth of a thermophilic Bacillus. *Braz. J. Microbiol.*, 32:271-275.
- Nunes, A. S. (2000) 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.
- Novozyme (2002). Disponível em: <http://novozyme.com> . Acessado em: agosto de 2002.
- Perona, J.J.; Craik, C.S. (1995) Structural basis of substrate specificity in the serine protease. *Prot. Sci*, 4:337-360.
- Peterson, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochem.*, 83, 346-356. 1977.
- Phadatare, S.U.; Deshpande, V.V.; Srinivasan, M.C. (1993). High activity alkaline protease from *Conidiobolus coronatus* (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents. *Enz. Microbiol. Technol.*, 15:72-76.
- Priest, F.G. (1977). Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol. Rev.*, 41:711-753.
- Rahman, R.N.Z.A.; Razak, C. N.; Ampon, K.; Basri, M.; Yunus, W. M. Z.; Salleh, A.B. (1994). Purification and characterization of heat-stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1. *Appl. Microbiotechnol.* 40:822-827.
- 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.
- Rawlings, N. D. and Barret, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochemistry Journal*. 290: 205-218.

- Rinker, K.D.; Han, C.J.; Adams, M.W.W.; Kelly, R.M. (1999) Cultivation of hiperthermophilic and Extremely Thermoacidophilic Microorganisms. *In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2ªEd., 830p.
- Rocha, J. M. S. (SD). Aplicações de Agentes Tensoactivos em Biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia*.5-11.
- Romero, F.J. ; Garcia, L. A. ; Salas, J. A. ; Díaz, M. ; Quirós, L. M. (2001). Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from *Serratia marcessens* growin whey. *Process Biochemistry*. 36:507-515.
- Santos, H.; Lamosa, P.; Costa, M.; (2001) Extremófilos: Microrganismos à prova de Agressões Ambientais Extremas. Biotecnologia Microbiana: *Boletim de Biotecnologia*. N.2.
- Scandurra, R.; Consalvi, V.; Chiaraluce, R.; Politi, L.; Engel, P. C. (1998). Protein Thermostability in Extremophiles. *Biochimie*. 80: 933-941.
- Sgarbieri, V.C. (1996). Proteínas em Alimentos Protéicos : Propriedades, Degradações, Modificações. São Paulo. Livraria Varela.
- Sinha, N.; Satyanarayana, T. (1991). Alkaline protease by thermophilic *Bacillus licheniformis*. *Indian J. Microbiol.*, 31:425-430.
- Singh, J.; Vohra, R.M.; Sahoo, D.K. (2003). Enhanced production of alkaline protease by *Bacillus sphaericus* using fed-batch culture. *Process Biochem*, 1-9.
- Singh, J.; Batra, N.; Sobti, C.R. (2001). Serine alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. SSR1. *Proc. Biochem.*, 36:781-785.
- Singh, A.; Ghosh, V. K.; Ghosh, P. (1994). Production of thermostable acid protease by *Aspergillus niger*. *Letters in Applied Microbiology*.18:177-180
- Siso, M. I. G. (1996). The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*. 57:1-11.
- Sookkheo, B.; Sinchaikul, S.; Phutrakul, S.; Chen, S. T. (2000). Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Prot. Exp. Pur.*, 20:142-151.
- Stoner., M.R.; Dale, D.A.; Gualfetti, P.J.; Becker, T.; Manning, M.C.; Carpenter, J.F.; Randolph, T.W. (2004). Protease autolysis in heavy-duty liquid detergent formulations: effects of thermodynamic stabilizer and protease inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*. 34:114-125.
- Szilágyil, A.; Závodszky, P. (2000). Structural Differences Between Mesophilic, Moderately Thermophilic na Extremely Thermophilic Protein Subunits: Results of Comprehensive Survey. *Structure*. 8:493-504.
- 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. *Química Nova*. 21:722-725.

Tolner, B.; Poolman, B.; Konings, W.N. (1997). Adaptation of microorganisms and their transport systems to high temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol.118A. 3:423-428.

Tomazic, S. J. (1991). Protein Stabilization. In: Biocatalysts for industry. Topic in Applied Chemistry. Ed. Plenum Press, New York and London. 330p.

Tortora, G. J.; Funke, B.R.; Case, C.L. (2002). Microbiologia. 6^a Ed., Editora ARTMED, São Paulo, Brasil.

Tunga, R.; Shrivastava, B.; Banerjee, R. (2003). Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry* 38:1553-1558.

Vieille, C.; Zeikus, J. G. (1996). Thermostable enzymes: identifying molecular determinants of protein structural and functional stability. *Tibtech*. 14:183-190

Ward, O. P.; Young, M. M. (1988). Thermostable Enzymes. *Biotech. Adv.* 6:39-69.

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.

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